

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA BONANCIO CERQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM
PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLIOTOXINA EM PLASMA HUMANO PARA
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA ASPERGILOSE**



CURITIBA

2013

LETICIA BONANCIO CERQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM
PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLIOTOXINA EM PLASMA HUMANO PARA
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA ASPERGILOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Co-orientadora: Prof. Dr^a Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2013

Cerqueira, Letícia Bonancio

Desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para quantificação de gliotoxina em plasma humano para diagnóstico precoce da aspergilose / Letícia Bonancio Cerqueira – Curitiba, 2013. 125 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Professora Dra. Francinete Ramos Campos

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Gliotoxina. 2. Aspergilose. 3. LC-MS/MS. 4. Diagnóstico. Pontarolo, Roberto. II. Campos, Francinete Ramos. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 589.23

TERMO DE APROVAÇÃO

LETÍCIA BONÂNCIO CERQUEIRA

**Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
POR CLAE-EM/EM PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
GLIOTOXINA EM PLASMA HUMANO VISANDO O
DIAGNÓSTICO PRECOCE DE ASPERGILOSE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador



Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Marco André Cardoso
Faculdades Pequeno Príncipe

Curitiba, 22 de fevereiro de 2013.

Aos meus pais, *Jorge Mendes Perqueira e Selma Bonâncio Perqueira*, por todo amor e carinho, por serem meus primeiros e mais amados mestres.

Ao *Artur Vitor Dembiski*, pela paciência, pela alegria, pela disposição, pela preocupação, por todo amor, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, doaram seu tempo e conhecimento sem nada esperar em troca. Muito Obrigada, sem vocês não seria possível.

Aos meus pais, Jorge e Selma, meus irmãos, Fernando e Diego e meu sobrinho Augusto, pela riqueza do dia-a-dia, pela segurança e alegria de voltar para casa sabendo que vocês estarão sempre lá.

Ao Artur Vitor Dembiski, por toda paciência, carinho e incentivo. Pelo amor e dedicação, imprescindíveis para mim e para realização desse trabalho.

À toda família Dembiski, Élio, Selma, Ana, Alberto e incluindo Laura Ribas, por me acolherem como família, por compartilhar momentos maravilhosos e pelo incentivo constante à pesquisa

À toda família Barbosa de Souza, Beo, Zeza, Mel e Gui, minha família de coração há muitos anos. Pela amizade pura, completa e inabalável, mesmo com a tradicional ausência de um pós-graduando.

Aos amigos do laboratório Flávia, Mário, Carol, Marco, Cleverson, Sirlei e Consuelo por estarem sempre dispostos e contribuírem sempre, cada um à sua maneira, seja cientificamente ou nem tanto, mas sempre tornando o trabalho muito melhor e mais divertido.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade e de Atenção Farmacêutica e novos mestrandos que, apesar de nem sempre estarmos juntos, somos uma equipe, torcendo pelo sucesso uns dos outros e ajudando no que for possível.

À Gabriele, Helena, César, Francis, Vitor e todos os estagiários que passaram pelo CEB nesses mais de três anos. Pela dedicação, ajuda e pela torcida para que desse tudo certo, sem vocês seria muito mais difícil.

Ao CNPq e ANVISA pelo financiamento do projeto.

Ao Hemepar por ceder as bolsas de plasma branco para esta pesquisa

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná por disponibilizar as amostras de pacientes e os resultados do teste de ELISA

À Rosangela Lameira Pinheiro, Marisol Dominguez Muro, Emilia Marico Giusni, Adriana de Fátima Gabriel e Maria Aparecida Lemes da Rocha do Hospital de Clínicas da UFPR pela atenção e colaboração na coleta e armazenamento das amostras utilizadas na pesquisa.

Ao Prof.Dr. Geraldo Picheth e Prof^a Dr^a Marileia Scartezini meus orientadores de iniciação científica, por me ensinarem os terrores e os prazeres da pesquisa científica.

À Dr^aThais Martins Guimarães de Francisco pelas correções, ajudas na escrita e na prática e, mas principalmente pela amizade, por tornar o laboratório um lugar alegre, divertido, perfumado e lindo.

À Letícia Paula Leonart ex-estagiária e mais nova mestranda do CEB, por toda ajuda nesse e em todos os outros trabalhos desenvolvidos, pela amizade e incentivo. Por todas as pequenas coisas que fazem nosso dia melhor.

Ao MSc.João Cleverson Gasparetto pela surpresa. Surpresa de encontrar em você mais que um colega e um pesquisador disposto a ensinar o que sabe. Além de tudo isso, você trouxe a alegria e a motivação incondicional em pesquisar, descobrir, trabalhar, refazer, sendo feliz sempre. Por me ajudar muito na pesquisa, mas principalmente pela amizade.

À prof.Dr^a Francinete Ramos Campos, pelos ensinamentos valiosos sobre a ciência e a vida. Pela paciência, pelo tempo e esforços dedicados à ciência, sem nunca se deixar abater. Pela amizade sempre, por acreditar em mim e por me apresentar o mundo mágico da espectrometria de massas.

E, finalmente, ao Prof.Dr Roberto Pontarolo por se dedicar por completo a Universidade e, mesmo com todas as responsabilidades e todos os seus orientados, se preocupar com cada um deles. Por possibilitar o desenvolvimento científico de muitas pessoas, inclusive o meu, por ser o “pai científico” de todos esses “filhos do Pontarolo”.

Enfim, a todos contribuíram da sua forma e torceram pelo sucesso desse trabalho,

Muito obrigada!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis".

José de Alencar

RESUMO

A aspergilose é uma infecção oportunista causada por fungos do gênero *Aspergillus*. É uma das principais complicações que acometem pacientes imunossuprimidos, podendo atingir índices de mortalidade de até 80%. O principal agente causador dessa infecção é o *A. fumigatus*, também considerada a principal espécie produtora de gliotoxina. Esta toxina é um produto do metabolismo secundário fúngico, apresenta comprovada toxicidade frente às células do sistema hematopoético e já foi detectada em soro de pacientes com diagnóstico positivo de aspergilose, podendo ser considerada um potencial biomarcador para o diagnóstico da doença. Atualmente o método de escolha para o diagnóstico da aspergilose é imunoenzimático, mas oferece apenas um indicativo da infecção, sendo necessários três resultados positivos consecutivos para que ela seja confirmada. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) surge como uma nova alternativa para o diagnóstico, uma vez que é capaz de fornecer resultados com alta precisão e exatidão, e excelente sensibilidade. Nesse sentido, esse trabalho visa o desenvolvimento de um método por CLAE-EM/EM para detecção de gliotoxina em plasma de pacientes imunossuprimidos com suspeita de aspergilose. Para isso, alíquotas de plasma branco foram fortificadas com gliotoxina e submetidas ao processo de extração líquido-líquido, utilizando uma solução de éter etílico/acetato de etila (50:50, v/v), agitada em vórtex por 3 min. A fase orgânica foi recuperada e, em seguida, evaporada. O resíduo obtido foi resuspendido em uma solução de ACN/H₂O (98:2, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico (AFO). As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo Agilent 1200 acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo API 3200 da ABSciex, provido de fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operado no modo negativo de ionização. O experimento de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) foi utilizado para monitorar as transições dos íons de m/z 325→243 e m/z 325→261 referente à gliotoxina e m/z 301→179 e m/z 301→151 referentes ao padrão interno (quercetina). A separação cromatográfica foi obtida em uma coluna C18 XBridge (150 x 2,1 mm i.d; 5 µm) e pré-coluna (XBridge C18, 10 x 2,1 mm i.d; 5 µm). A fase móvel foi constituída de solução de NH₄HCO₂ 1mM (A) e ACN contendo 5% de solução 1mM de NH₄HCO₂ (B) submetidos ao seguinte gradiente de eluição: $t_{0-0,10}$ min.: 65%-0% A; $t_{0,10-0,70}$ min.: 0% A; $t_{0,7-0,71}$ min.: 0-65% A; $t_{0,71-4,00}$ min.: 65% A. O tempo de corrida foi de 4 min. em um fluxo de 0,45 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. O método desenvolvido foi validado, considerado sensível, seletivo, linear ($r > 0,99$) na faixa de 10 a 120 ng/mL, preciso, exato e livre de efeitos residuais e de matriz. O método foi aplicado com sucesso a 30 amostras reais de pacientes com suspeita de aspergilose, com 70% de concordância com os resultados obtidos pelo método de ELISA. O presente trabalho confirmou que é possível quantificar a gliotoxina em plasma através da técnica de CLAE-EM/EM e sua aplicação como diagnóstico é uma possibilidade real e muito promissora.

Palavras chave: Gliotoxina, Aspergilose, LC-MS/MS, diagnóstico.

ABSTRACT

Aspergillosis is an opportunistic infection caused by fungi of the genus *Aspergillus*. It is a major complication of immunocompromised patients and its mortality can reach up to 80%. The main causative agent of this infection is *A. fumigatus*, which is also the main gliotoxin-producing species. This toxin is a product of fungal secondary metabolism and has been shown toxicity against hematopoietic system cells. It has already been detected in sera samples of patients with positive diagnosis of aspergillosis and, for this reason, can be considered as a potential biomarker for diagnosis of this disease. Immunoenzymatic assay is the currently gold standard method for diagnosing Aspergillosis but it only provides an indicative of infection, requiring three consecutive positive results to confirm the diagnosis. The high performance liquid chromatography coupled *tandem* mass spectrometry (HPLC-MS/MS) appears as a new alternative for the diagnosis of aspergillosis, since it is capable to provide high precision and accuracy results with excellent sensitivity. On this way, this work aims to develop an HPLC-MS/MS method for the detection of gliotoxin in plasma of patients with suspected infection by *Aspergillus*. For this, aliquots of blank plasma were spiked with gliotoxin and submitted to liquid-liquid extraction, using a solution of ethyl ether / ethyl acetate (1:1, v/v). The organic phase was recovered and then evaporated. The residue obtained was resuspended in a solution of ACN/H₂O (98:2, v/v) with 1 mM of NH₄HCO₂. Analyses were performed using an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled to mass spectrometer API 3200 triple quadrupole ABSciex provided with electrospray ionization source (ESI) operated in the negative ion mode. The experiment Multiple Reaction Monitoring (MRM) was used to monitor the transition of the ions of m/z 325 \rightarrow 243 and m/z 325 \rightarrow 261 corresponding to gliotoxin and m/z 301 \rightarrow 179 and m/z 301 \rightarrow 151 related to internal standard (quercetin). The chromatographic separation was obtained in a XBridge C18 column (150 x 2.1 mm id; 5 mm) and guard column (XBridge C18, 10 x 2.1 mm id, 5 mm). The mobile phase was composed of 1 mM NH₄HCO₂ solution (A) and MeCN containing 5% NH₄HCO₂ 1mM (B) eluted by the following gradient: $t_{0-0,10}$ min: 65% -0% A; $t_{0,10-0,70}$ min: 0% A; $t_{0,70-0,71}$ min: 0-65% A; $t_{0,71-4,00}$ min: 65% A. The run time was 4 min at a flow rate of 0.45 mL / min. The injection volume was 20 μ L. The method was fully validated, being considered linear ($r > 0.99$) in the range of 10 to 120 ng/ mL, sensitive, selective, precise, accurate and free of matrix and carry over effects. The method was successfully applied to real samples from 30 patients with suspected aspergillosis, reaching 70% of agreement with ELISA results. This study confirmed that it is possible to quantify gliotoxin in plasma using the technique of HPLC-MS/MS and the present method can be potentially applied for aspergillosis diagnosis.

Keywords: Gliotoxin, Aspergillosis, LC-MS/MS, diagnosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	FÓRMULA ESTRUTURAL DA GLIOTOXINA.	26
FIGURA 2 –	ESQUEMA GERAL DE UM ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.	43
FIGURA 3 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA GLIOTOXINA.	61
FIGURA 4 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.	62
FIGURA 5 –	ESPECTRO DE MASSAS DE SOLUÇÃO DE GLIOTOXINA NA CONCENTRAÇÃO DE 150 ng/mL	81
FIGURA 6 –	CROMATOGRAMA OBTIDO DA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM GLIOTOXINA (70 ng/ mL) E PI (5 ng/ mL).	85
FIGURA 7 –	SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS TRANSIÇÕES DA GLIOTOXINA (A) E PI (B) OBTIDAS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO, LIPÊMICO, BRANCO DE SORO NORMAL E BRANCO DE PLASMA FORTIFICADO COM LIQ.	89
FIGURA 8 –	CROMATOGRAMA DE TRANSIÇÕES DE GLIOTOXINA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA BRANCO FORTIFICADO NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 3 ng/mL.	91
FIGURA 9 –	CROMATOGRAMA DE TRANSIÇÕES DE GLIOTOXINA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA BRANCO FORTIFICADO NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 10 ng/mL.	92
FIGURA 10 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLIOTOXINA, 1º DIA.	93
FIGURA 11 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLIOTOXINA, 2º DIA.	93
FIGURA 12 –	CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE GLIOTOXINA, 3º DIA.	94
FIGURA 13 –	CROMATOGRAMAS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL POR CLAE-EM/EM. PLASMA BRANCO (A1, A2, A4 E B1, B2, B4); AMOSTRA FORTIFICADA COM GLIOTOXINA, LSQ, (A3) E COM O PI (B3).	99

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	ÁREA DOS PICOS DE GLIOTOXINA E PI UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO.....	87
GRÁFICO 2 –	CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS CONFORME A PROCEDÊNCIA.....	108
GRÁFICO 3 –	COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DOS RESULTADOS DO TESTE DE ELISA PARA AMOSTRAS POSITIVAS.....	110
GRÁFICO 4 –	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CONFORME PROCEDÊNCIA E PORCENTAGEM DE POSITIVAS E NEGATIVAS DENTRE AS AMOSTRAS DE QUIMIOTERAPIA E DE QUARTO ALTO RISCO.....	111
GRÁFICO 5 –	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS MÉTODO DE ELISA E CLAE-EM/EM.....	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADITIVO E PROPORÇÃO DE SOLVENTES PARA TESTE DE SOLUÇÃO DILUENTE.....	64
TABELA 2 –	VALORES DE CONSTANTE DIELÉTRICA DOS SOLVENTES TESTADOS PARA EXTRAÇÃO.....	68
TABELA 3 –	PROPORÇÃO DE SOLVENTES UTILIZADOS PARA TESTE DE EXTRAÇÃO.....	69
TABELA 4 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.	70
TABELA 5 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	71
TABELA 6 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA O MONITORAMENTO EM PLASMA DA GLIOTOXINA E QUERCETINA (PI).....	82
TABELA 7 –	LINEARIDADE 1º DIA.....	94
TABELA 8 –	LINEARIDADE 2º DIA.....	95
TABELA 9 –	LINEARIDADE 3º DIA.....	95
TABELA 10 –	PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 1º DIA.....	96
TABELA 11 –	PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 2º DIA.....	96
TABELA 12 –	PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 3º DIA.....	97
TABELA 13 –	PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS.....	97
TABELA 14 –	RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ.....	100
TABELA 15 –	RESULTADO DO TESTE DE RECUPERAÇÃO.....	101
TABELA 16 –	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO.....	103

TABELA 17 –	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE, PREPARADAS A PARTIR DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO DE 1000 ng/ mL.....	105
TABELA 18 –	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE, PREPARADAS A PARTIR DAS SOLUÇÕES PADRÃO ESTOQUE DE 1 mg/ mL.....	106
TABELA 19 –	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS NEGATIVAS (ELISA) E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO MÉTODO ELISA E CLAE-EM/EM.....	113
TABELA 20 –	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS (ELISA) E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO MÉTODO ELISA E CLAE-EM/EM.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	– Aspergilose Invasiva
APCI	– <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> / Ionização Química a Pressão Atmosférica
CAD	– <i>Collisionally Activated Dissociation</i> / Gás de colisão
CE	– <i>Collision Energy</i> / Energia de Colisão
CEP	– Potencial de Entrada na cela de colisão
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-EM/EM	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial
CQA	– Controle de Qualidade Alta concentração
CQB	– Controle de Qualidade Baixa concentração
CQD	– Controle de Qualidade de Diluição
CQ-LIQ	– Controle de Qualidade do Limite Inferior de Quantificação
CQM	– Controle de Qualidade Média concentração
CUR	– <i>Curtain gas</i> / Gás de interface
CV	– Coeficiente de Variação
CXP	– <i>Collision Cell Exit Potential</i> / Potencial de Saída da Cella de Colisão
DP	– Desvio Padrão
ELISA	– <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> / Ensaio de Enzima Ligada a um Imunosorbente
EP	– <i>Entrance Potential</i> / Potencial de Entrada
EPR	– Erro Padrão Relativo
ESI	– <i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por Electrospray
FIA	– <i>Flow Infusion Analysis</i> / Análise por Infusão em Fluxo
FMN	– Fator Matriz Normalizada por Padrão Interno
GS1	– <i>Nebulizer gas</i> / Gás de nebulização
GS2	– <i>Turbo gas</i> / Gás auxiliar
HPTLC	– <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
ICR	– <i>Íon Cyclotron Resonance</i> / Ressonância Ciclotrônica de Íons
IFIO	– Infecções Fúngicas Invasivas Oportunistas
IS	– <i>Ion Spray voltage</i> / Voltagem do capilar
LSQ	– Limite Superior de Quantificação
MRM	– <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
PI	– Padrão Interno
QT	– Quimioterapia

QT-AR	–	Quarto de Alto Risco
TMO	–	Transplante de Medula Óssea
TOF	–	<i>Time of Flight</i> / Tempo de Voo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 IMUNOSSUPRIMIDOS E INFECÇÕES OPORTUNISTAS	23
2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS	23
2.3 ASPERGILOSE	24
2.4 GLIOTOXINA	26
2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICO	28
2.5.1 Métodos Microbiológicos e Histopatológicos	28
2.5.2 Métodos por Imagem	31
2.5.3 Métodos Enzimáticos	32
2.5.4 Métodos Imunológicos	32
2.5.5 Métodos por Biologia Molecular	34
2.5.6 Novos Métodos	35
2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	36
2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	36
2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM)	38
2.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS POR CLAE-EM/EM	43
2.8 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	44
2.8.1 Extração por Precipitação de Proteínas	44
2.8.2 Extração Líquido-Líquido	46
2.8.3 Extração em Fase Sólida	47
2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	48
2.9.1 Especificidade e Seletividade	49
2.9.2 Limite de Detecção	51
2.9.3 Limite Inferior de Quantificação	52
2.9.4 Linearidade	53
2.9.5 Precisão	54
2.9.6 Exatidão	55
2.9.7 Efeito residual (<i>Carryover</i>)	56
2.9.8 Efeito Matriz	56
2.9.9 Recuperação	57
2.9.10 Controle de Qualidade	58
2.9.11 Estudo de Estabilidade	59
3 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES	61
3.2 OBTENÇÃO DE PLASMA E SORO	62
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES	63
3.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTROMETRO DE MASSAS	63
3.5 OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	65
3.6 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA GLIOTOXINA DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO	66

3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	70
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	72
3.8.1 Seletividade	72
3.8.2 Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação.....	73
3.8.3 Linearidade e Controles de Qualidade	73
3.8.4 Precisão e Exatidão	74
3.8.5 Efeito Residual (<i>Carryover</i>).....	75
3.8.6 Efeito Matriz.....	75
3.8.7 Recuperação	76
3.8.8 Teste de Estabilidade	77
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS	78
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTROMETRO DE MASSAS	80
4.2 OTIMIZAÇÃO DE PARAMETROS DA CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	83
4.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA GLIOTOXINA DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO	85
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	87
4.4.1 Seletividade	88
4.4.2 Limites de Detecção e Limite Inferior de Quantificação	90
4.4.3 Linearidade	92
4.4.4 Precisão e Exatidão	96
4.4.5 Efeito Residual (<i>Carryover</i>).....	98
4.4.6 Efeito Matriz.....	100
4.4.7 Recuperação	101
4.4.8 Teste de Estabilidade	102
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS	107
5 CONCLUSÃO	115
REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Pacientes submetidos à transplantes iniciam terapia com medicamentos imunossupressores, fármacos que diminuem a resposta imune do paciente, para evitar a rejeição do órgão recém transplantado. Em função disso, tornam-se vulneráveis, ou seja, mais suscetíveis a patógenos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) oportunistas comumente encontrados livres no meio ambiente. Essas infecções são frequentes, muito graves e responsáveis por grande parte dos óbitos após a cirurgia (NUCCI;MAIOLINO, 2000). As infecções fúngicas invasivas oportunistas (IFIO) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos.

As IFIOs são causadas principalmente por micro-organismos dos gêneros *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Mucorales spp.*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidioides spp.*, *Paracoccidioides spp.*, e *Penicillium spp.* Destacamos o gênero *Aspergillus*, causador da micose oportunista chamada aspergilose (PASQUALOTTO;DENNING, 2005). Trata-se da segunda micose oportunista mais frequente, superada apenas pelas candidíases. (RICHARDSON, 2005). Apenas 20 das mais de 200 espécies do gênero *Aspergillus* foram descritas como agentes etiológicos de doenças. As espécies frequentemente isoladas são *A.niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. fumigatus* (RICHARDSON, 2005). O *A. fumigatus* é a espécie com maior poder patogênico, responsável por aproximadamente 90% das aspergiloses invasivas (AI) diagnosticadas (LATGE, 1999). Além disso, essa espécie é também a principal causadora de doenças do trato respiratório, incluindo manifestações alérgicas, colonização nas cavidades aéreas e a quase todos os casos de aspergilose invasiva letal (KWON-CHUNG;BENNETT, 1992). A aspergilose pode manifestar-se em diferentes órgãos e tecidos, como coração, aparelho auditivo, cérebro e epiderme, porém são predominantemente observadas as infecções pulmonares (KONTOYIANNIS *et al.*, 2005).

A incidência da AI cresceu muito nos últimos 10 anos, principalmente em função do aumento no número de pacientes submetidos a transplantes e do aumento na severidade das terapias imunossupressoras. (LOMBARDI *et al.*,

2002). Trata-se de uma das complicações infecciosas mais graves em pacientes com comprometimentos hematológicos (leucemia aguda, por exemplo) e em transplantados de medula óssea, com uma prevalência de 60% a 80% (KONTOYIANNIS *et al.*, 2005). A taxa de mortalidade em portadores de leucemia ou linfoma que estejam sob tratamento com quimioterapia tradicional é de aproximadamente 50% e, em casos de pacientes alotransplantados de medula óssea o valor ultrapassa 80% (MAERTENS *et al.*, 2002; JARQUE *et al.*, 2003; BELLOCCHIO *et al.*, 2005).

O diagnóstico da aspergilose é bastante complicado e, na maioria das vezes, acontece de forma tardia. Os sintomas clínicos apresentados são semelhantes aos de outras doenças causadas por fungos e podem ser mascarados pelo uso da medicação. Desta forma, o tratamento não é prontamente instituído o que diminui sua eficácia e aumenta a letalidade da doença. Muitos trabalhos publicados relatam técnicas convencionais microbiológicas, histológicas e radiológicas para o diagnóstico desta IFOI, porém estas técnicas possuem baixa sensibilidade e especificidade, demorando vários dias até a confirmação do diagnóstico, revelam altas taxas de resultados falso-positivos e têm um impacto limitado sobre a tomada da decisão clínica (PASQUALOTTO;DENNING, 2005). Outros procedimentos para obter o diagnóstico incluem métodos mais invasivos, como biópsias, as quais não são interessantes em virtude do estado debilitado do paciente (HERBRECHT;LETSCHER-BRU *et al.*, 2002; JARQUE *et al.*, 2003; PAZOS;DEL PALACIO, 2003).

O teste para o diagnóstico da aspergilose é comumente realizado através do método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos. O teste detecta a presença de galactomananas, com um limite de detecção entre 0,5 a 1,0 ng/mL (LATGE *et al.*, 1994; MENNINK-KERSTEN;DONNELLY;VERWEIJ, 2004; WHEAT;WALSH, 2008). Galactomananas são polissacarídeos de parede celular encontradas em várias espécies do gênero *Aspergillus* e são liberados na circulação sanguínea após a infecção (BAHIA *et al.*, 1997; MENNINK-KERSTEN;DONNELLY;VERWEIJ, 2004). Apesar dos resultados bastante promissores, estudos avaliando os ensaios de quantificação de galactomananas

para diagnóstico de aspergilose invasiva revelaram cerca de 80% de resultados falso-positivos em pacientes pediátricos e neonatos, possivelmente relacionados com a reação cruzada com *Bifidobacterium bifidum*. (MENNINK-KERSTEN;DONNELLY;VERWEIJ, 2004).

Existem também métodos de diagnóstico que avaliam a doença com base na presença de metabólitos secundários. Alguns autores relatam que as micotoxinas liberadas pelos fungos estão relacionadas à supressão da função imunitária do hospedeiro, um dos possíveis mecanismos para que o fungo escape do sistema imune do paciente (LATGE, 1999; BONDY;PESTKA, 2000). O metabólito mais tóxico produzido durante o crescimento das hifas dos fungos do gênero *Aspergillus* é a gliotoxina, um alcalóide tricíclico pertencente à classe de metabólitos secundários dos fungos chamada epipolítiodioxopiperazinas (WARING;BEAVER, 1996). A gliotoxina é produzida por várias espécies de fungos por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Eurotium chevalieri*, *Gliocladium fimbriatum* e também algumas espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium spp.* Ela desempenha um papel importante na patobiologia do *Aspergillus fumigatus*, uma vez que ela modula a resposta imune e induz a apoptose em diferentes tipos celulares. A toxicidade desta substância foi atribuída à ponte de dissulfeto intramolecular, responsável também pelas funções exercidas por outras toxinas da classe das epipolítiodioxopiperazinas. Devido à estrutura e extraordinária atividade da gliotoxina, este metabolito fúngico vem sendo objeto de muitas investigações (WARING;BEAVER, 1996). Sutton e colaboradores (1996) demonstraram que a administração *in vivo* da gliotoxina causou uma forte imunossupressão em ratos, a qual foi suficiente para estabelecer uma aspergilose invasiva após a inalação de conídios de *A. fumigatus* (SUTTON;WARING;MULLBACHER, 1996). Desde que foi observada a presença da gliotoxina em pulmões de ratos com aspergilose invasiva experimentalmente induzida, sugeriu-se que a toxina poderia contribuir para que o fungo escape das células do sistema imunitário do hospedeiro (LEWIS *et al.*, 2005). Além disso, uma vez que foi possível detectar a gliotoxina também no soro de pacientes com aspergilose invasiva, ficou evidenciado que a gliotoxina é produzida *in vivo* em seres humanos com AI (LEWIS *et al.*, 2005).

Nesse sentido, novos métodos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de AI, como por exemplo, a utilização de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance na detecção de gliotoxinas (PURI;AHMAD;PANDA, 2009). Ainda neste contexto, existe apenas uma citação na literatura utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) para detecção de gliotoxina em plasma de camundongos, porém, o enfoque está na parte clínica, não sendo reportados dados relativos ao método analítico (LEWIS *et al.*, 2005).

Entre as estratégias existentes hoje em dia para o diagnóstico precoce de doenças está a descoberta de biomarcadores indicativos da infecção (CHO, 2007). Os biomarcadores, como a gliotoxina, são importantes indicadores biológicos do estágio de uma doença e também da progressão do estado fisiopatológico de uma célula, sendo também muito utilizados para garantir a eficácia e a segurança de novos agentes terapêuticos. É conhecido que a presença de patologias promovem alterações características de um ou mais metabólitos específicos em tecidos e/ou biofluidos corporais. Por este motivo, os biomarcadores podem ser detectados no soro ou plasma sanguíneo, lágrima, suor, saliva, líquor dentre outros fluidos biológicos (VEENSTRA *et al.*, 2005).

Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos que proporcionem a detecção precoce de uma determinada patologia através da análise de um biomarcador eficiente para o diagnóstico da mesma é de extrema importância. É necessário que estes novos métodos sejam sensíveis, de baixo custo e que possam ser conduzidos de forma rápida. Nesse sentido, pode-se dizer que, a fim de diagnosticar uma infecção fúngica invasiva, como a aspergilose, de forma precoce, a espectrometria de massas oferece uma alternativa, uma vez que é uma técnica analítica que fornece resultados rápidos, sensíveis e seletivos. Além disso, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas pode ser utilizada na detecção de quantidades mínimas de metabólitos específicos, o que possibilita o diagnóstico da doença em seus estágios iniciais, permitindo que o tratamento seja efetuado o mais cedo possível. Considera-se ainda que o desenvolvimento de novas metodologias, rápidas, não invasivas e de baixo custo, possibilitam a sua aplicação no sistema público de saúde, contribuindo para que

um maior número de pessoas seja beneficiado, aumentando a expectativa de sobrevida destes pacientes.

Uma vez que os métodos convencionais, tais como cultura de amostras biológicas, microscopia direta e histopatologia, possuem baixa sensibilidade e especificidade, demorando vários dias até a confirmação do resultado e que este tipo de técnica pode fornecer resultados falsos comprometendo a saúde do paciente, surge a necessidade da utilização de novas tecnologias, capazes de proporcionar resultados mais confiáveis para o diagnóstico desta IFIO. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), para ser empregado na detecção da gliotoxina em plasma humano e futuramente como método de rotina para o diagnóstico aspergilose invasiva em pacientes imunossuprimidos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por CLAE-EM/EM para detecção e quantificação de gliotoxina em plasma humano.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o método de extração da gliotoxina da matriz plasma;
- Estabelecer um método por CLAE-EM/EM para análise de gliotoxina em plasma, utilizando a ferramenta de MRM;
- Validar o método bioanalítico desenvolvido de acordo com a legislação vigente;
- Obter e quantificar as amostras de plasma de pacientes imunossuprimidos com suspeita de aspergilose através do método desenvolvido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMUNOSSUPRIMIDOS E INFECÇÕES OPORTUNISTAS

Transplantes de órgãos são realizados com grande frequência em vários hospitais do Brasil. Somente no primeiro semestre de 2011 foram realizados 4071 transplantes de órgãos e células dos quais 793 foram transplantes de medula óssea, o segundo mais realizado, ficando atrás somente do transplante de rins (ABTO, 2011). São procedimentos de custo elevado, invasivos e de difícil realização, por esse motivo requerem maior atenção no período pós-operatório. Antes e após a cirurgia ocorre a terapia com imunossupressores, fármacos que diminuem a resposta imune do paciente para evitar a rejeição do órgão recém-transplantado. Entretanto esse procedimento deixa o organismo com sistema imune deficiente e, portanto, suscetível à patógenos oportunistas, comumente encontrados livres no ambiente. As doenças oportunistas são aquelas facilitadas por disfunção no mecanismo de defesa básico em hospedeiros imunocomprometidos (EMMANOUILIDES; GLASPY, 1996). Dentre estas infecções, as fúngicas são a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos pós-transplante e frequentemente letais (ASCIOGLU *et al.*, 2002).

2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS

As infecções fúngicas invasivas são causadas principalmente pelos gêneros *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Mucorales spp.*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidioides spp.*, *Paracoccidioides spp.*, *Penicillium spp.*

Destaca-se entre eles o gênero *Aspergillus* (PASQUALOTTO;DENNING, 2005) causador da micose oportunista aspergilose. Os micro-organismos deste gênero são saprófitas e ubíquos, encontrados esporadicamente nas vias aéreas de indivíduos saudáveis (PEIXINHO *et al.*, 2003).

2.3 ASPERGILOSE

Aspergilose é uma doença infecciosa causada por fungos do gênero *Aspergillus*. Trata-se da segunda micose oportunista mais frequente, ficando atrás apenas das candidoses (RICHARDSON, 2005).

A incidência de aspergilose cresceu dramaticamente nos últimos 10 anos, principalmente em função do aumento no número de pacientes imunocomprometidos e do aumento na severidade das terapias imunossupressoras. Os dados de mortalidade dessa infecção são elevados, podendo atingir valores de 50 a 100% (LOMBARDI *et al.*, 2002). A prevalência da aspergilose em portadores de leucemia aguda e pós-transplantados de medula óssea é de 60% a 80% (KONTOYIANNIS *et al.*, 2005). Trata-se de uma das complicações infecciosas mais graves em pacientes com comprometimentos hematológicos, com taxas de mortalidade de aproximadamente 50% em portadores de leucemia ou linfoma sob tratamento com quimioterapia tradicional e ultrapassando valores de 80% em alotransplantados de medula óssea (MAERTENS *et al.*, 2002; JARQUE *et al.*, 2003; BELLOCCHIO *et al.*, 2005).

A aspergilose pode manifestar-se em diferentes órgãos e tecidos, como coração, aparelho auditivo, cérebro, epiderme, sendo predominantemente observadas infecções pulmonares (KONTOYIANNIS *et al.*, 2005).

Dentre as manifestações clínicas pulmonares podemos destacar o aspergiloma, caracterizado pela formação de uma massa de hifas no interior da cavidade pulmonar superior, conhecida também como “bola de fungos” (O’FEL, 1997). Essa apresentação da aspergilose tem como principal complicação a hemoptise recidivante e abundante que consiste em episódios intermitentes de

pequenas hemorragias sucessivas, podendo em muitos casos levar a morte (RICHARDSON E WARNOK, 2003, HOPE *et. al* 2005).

Outra forma pulmonar de manifestação da aspergilose se dá através da aspergilose invasiva (AI), nessa situação o desenvolvimento do fungo se dá no parênquima pulmonar do paciente. (HILTERMANN *et al.*, 2003). A AI pode evoluir de duas maneiras distintas, como aspergilose pulmonar necrosante crônica ou aspergilose invasiva clássica, de acordo com o quadro clínico do paciente. A forma necrosante crônica esta associada com casos ocasionais de imunodepressão, geralmente provenientes de doenças subjacentes de menor gravidade ou situações debilitantes do sistema imune como alcoolismo, desnutrição, etc. (HILTERMANN *et al.*, 2003; RAJA;SINGH, 2006). A forma clássica acomete geralmente pacientes severamente imunocomprometidos como em casos de leucemia, linfoma, transplante de medula óssea ou terapias farmacológicas a base de corticoides. (RICHARDSON E WARNOK, 2003). Em ambos os casos a evolução é frequente e rapidamente fatal, a menos que seja diagnosticada e combatida precocemente e de maneira eficaz. (HILTERMANN, 2003).

Apenas 20 das mais de 200 espécies desse gênero foram descritas como agentes etiológicos de doenças. As mais frequentemente isoladas são *A.niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. fumigatus* (RICHARDSON, 2005). A principal espécie identificada como causadora de aspergilose é o *Aspergillus fumigatus*, responsável por mais de 90% dos casos de aspergilose invasiva em humanos (LATGE, 2001). É o principal agente etiológico de algumas doenças do trato respiratório incluindo manifestações alérgicas, colonização nas cavidades aéreas e a quase todos os casos de aspergilose invasiva letal (KWON-CHUNG;BENNETT, 1992). Já foram relatados também casos envolvendo as espécies *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (STEINBACH, 2010). Uma das diferenças observadas entre a no metabolismo das espécies citadas é que o *A.fumigatus* é a espécie que produz mais produz gliotoxina.

2.4 GLIOTOXINA

A gliotoxina é um dos membros mais conhecidos da classe de metabolitos secundários dos fungos chamada epipolítiodioxopiperazinas. A estrutura que caracteriza os componentes dessa classe de metabólitos é a ponte dissulfeto ligada a uma piperazidiona, como podemos observar na Figura 1. A ponte dissulfeto é responsável por grande parte das atividades biológicas da gliotoxina, ainda não totalmente esclarecidas (WARING;BEAVER, 1996).

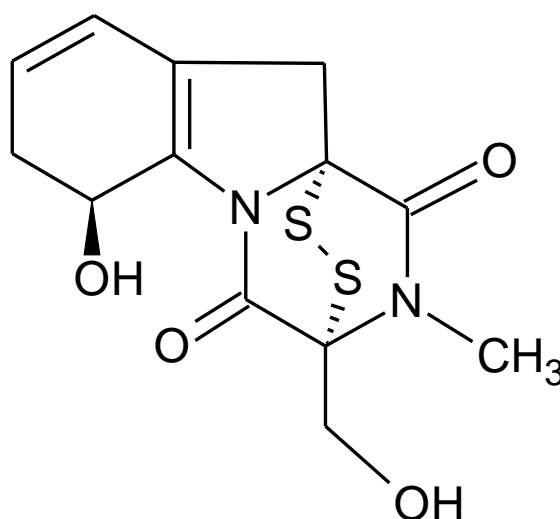


FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA GLIOTOXINA.

Inicialmente, a gliotoxina atraiu a atenção de pesquisadores em função de suas propriedades antimicrobiana e antiviral (TAYLOR, 1971). O interesse por esses estudos, porém, foi consideravelmente reduzido após a descoberta da toxicidade dessa molécula frente à células do sistema hematopoético, possivelmente relacionado a comprovada inibição de enzimas que necessitam do grupamento tiol (COMERA *et al.*, 2007). A hipótese mais aceita é de que esses grupamentos formam dissulfetos em contato com a ponte dissulfeto da gliotoxina, inativando seu sítio ativo (WARING;BEAVER, 1996) e com isso impossibilitando a utilização da gliotoxina no desenvolvimento de novos fármacos.

Estudos posteriores comprovaram que a gliotoxina apresenta propriedades inibitórias quanto a proliferação de células B e T, inibindo a fagocitose e a

reduzindo a efetividade de células T citotóxicas (WARING;BEAVER, 1996). Nesse mesmo período foi observada a preferência da interação da toxina com células do sistema imune (MULLBACHER *et al.*, 1987).

Outra via responsável pela toxicidade da gliotoxina no organismo ocorre através da indução da morte apoptótica das células. O mecanismo de indução de apoptose não é conhecido, porém, possivelmente relacionado a inibição da síntese de proteínas. A gliotoxina também demonstrou induzir morte celular por necrose (WARING;BEAVER, 1996).

Os mecanismos de ação da gliotoxina ainda não foram completamente elucidados, no entanto, pesquisas comprovaram importante participação na produção de espécies reativas de oxigênio (WARING;BEAVER, 1996), formação de compostos dissulfetos com grupos tióis livres, interferindo na atividade de enzimas (WARNING, 1995), e efeitos relacionados a liberação de cálcio no interior da célula (WARING;BEAVER, 1996). Apresenta também uma importante atividade imunossupressora. Em ensaios *in vitro*, a gliotoxina inibiu a fagocitose por timócitos, macrófagos, células T citotóxicas e linfócitos (KOSALEC;PEPELJNJAK, 2005). Em macrófagos e neutrófilos, a gliotoxina mostrou inibição de diferentes funções celulares, incluindo a produção de citocinas, apresentação de antígenos, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (FITZPATRICK;WANG;LE, 2000; NISHIDA *et al.*, 2005; STANZANI *et al.*, 2005).

Estas propriedades imunossupressoras, combinadas com o lançamento da micotoxina pelas hifas internas, propõem que a produção *in situ* da gliotoxina poderia contribuir para a patologia de aspergilose invasiva (TOMEI;KAUFFMAN, 2000). A gliotoxina é produzida *in vivo* em tecidos de animais infectados com *A. fumigatus* (BAUER *et al.*, 1989; RICHARD;DEBEY, 1995; RICHARD;DVORAK;ROSS, 1996; BONDY;PESTKA, 2000). De acordo com Lewis *et al.* (LEWIS *et al.*, 2005), ela foi detectada no soro de pacientes com aspergilose invasiva, indicando que a gliotoxina é produzida *in vivo*.

Com base nessas informações é possível considerar a gliotoxina como um potencial biomarcador para o diagnóstico da aspergilose, visto que está presente em quantidade suficiente e apresenta atividade relacionada a doença como proposto por Puri (PURI;AHMAD;PANDA, 2009). Segundo sua pesquisa as

amostras de soro de pacientes com aspergilose continham aproximadamente 100 ng/mL, o que condiz com o estudo de Lewis e colaboradores, onde relatam o doseamento de amostras com concentrações de gliotoxina entre 166 a 785 ng/mL (LEWIS *et al.*, 2005).

2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICO

Como já foi dito anteriormente, a aspergilose é uma doença séria que atinge diversos pacientes imunossuprimidos, podendo muitas vezes ser fatal (KAWAZU *et al.*, 2003; WHEAT, 2003).

O diagnóstico preciso é crítico e complicado, pois os sintomas clínicos não são específicos e muitas vezes são mascarados pelo uso da medicação. Outros procedimentos para obter o diagnóstico podem incluir métodos mais invasivos, como biópsias, que também não são indicados em função do estado debilitado do paciente (HERBRECHT; LETSCHER-BRU *et al.*, 2002; JARQUE *et al.*, 2003; PAZOS; DEL PALACIO, 2003). Apesar disso, o diagnóstico da aspergilose invasiva continua baseado em achados clínicos e achado histopatológico, comprometendo a saúde do paciente e dando margens a falsos diagnósticos. Dentre os métodos disponíveis destacam-se algumas técnicas.

2.5.1 Métodos Microbiológicos e Histopatológicos

As técnicas microbiológicas e histopatológicas estão entre as técnicas mais antigas para o diagnóstico das infecções e, mesmo com o passar dos anos, continuam sendo os métodos de escolha para confirmação de diversas doenças. Dentre as técnicas microbiológicas e histopatológicas, as mais comuns são a busca de produtos patológicos, exame direto e o exame cultural.

A busca de produtos patológicos consiste na avaliação de amostras como expectorações, aspirados, lavados brônquio alveolares, biópsias de entre as quais a transbronquial pulmonar, fluidos corporais como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano utilizadas na detecção precoce da aspergilose (STEVENS, 2002; KAWAZU *et al.*, 2003).

A biópsia transbronquial pulmonar muito dificilmente pode ser realizada, devido ao estado debilitado dos pacientes imunossuprimidos. A lavagem brônquio alveolar apresenta menos riscos, mostrando utilidade no diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva (KAWAZU *et al.*, 2003). No entanto, assim como biópsias obtidas através de agulhas guiadas, são pouco recomendados aos imunossuprimidos (DEL PALACIO; CUETARA; PONTON, 2003a).

Dentre os métodos de confiança utilizados para o diagnóstico de aspergilose invasiva, temos o exame histopatológico de secções de tecidos corados (RICHARDSON; WARNOCK, 2003). É efetuado após biópsia, em que o exame dos tecidos obtidos e corados por Gomori-Grocott. Este exame permite a visualização de filamentos septados com ramificações em ângulo agudo sem que se possa afirmar qual a espécie causadora (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; DEL PALACIO; CUETARA; PONTON, 2003a). No exame histopatológico é possível verificar, nos casos de alteração patológica do pulmão, a formação da “bola de fungos”. Do ponto de vista histopatológico, a “bola de fungos” consiste numa massa esférica de elementos hifais septados, ramificados e entrelaçados (DEL PALACIO; CUETARA; PONTON, 2003a). Tais estruturas podem também ser visualizadas em exames radiológicos como estruturas esféricas expansivas que se movimentam no interior da cavidade, conforme o doente muda de posição (SHARMA; CHWOGULE, 1998).

A observação por exame direto com KOH, calcoflúor ou coloração de um esfregaço pela técnica de Gram, permite um diagnóstico presuntivo e rápido (DEL PALACIO; CUETARA; PONTON, 2003b). Esta observação confirma a presença de um fungo no produto patológico, que venha a ser isolado nos meios de cultura.

As espécies de *Aspergillus* crescem habitualmente em poucos dias, na maioria dos meios de cultura e à temperatura ambiente (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2005). O isolamento de *Aspergillus* através de cultura, em meio de Czapeck, é um método de detecção da possível infecção,

permite a identificação da espécie infectante, bem como a realização de testes de sensibilidade *in vitro* aos compostos antifúngicos. Embora as espécies de *Aspergillus* sejam nutricionalmente pouco exigentes, deve-se utilizar meios de cultura sem cicloheximida sempre que se suspeite de infecção por fungos deste gênero, já que esta inibe o seu crescimento, (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003b).

As espécies de *Aspergillus* patogênicas para o homem são capazes de crescer rapidamente a 37°C e, algumas espécies, toleram temperaturas acima dos 50°C. No entanto, a incubação dos meios de cultura deve ser realizada a uma temperatura compreendida entre os 25 e os 37°C, por um período de até quatro semanas, e, se possível, utilizando tubos em vez de placas, uma vez que a desidratação nestas é maior do que a que se verifica nos tubos (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003b; BHABHRA;ASKEW, 2005). Embora culturas do lavado brônquio alveolar sejam específicas e permitam a determinação das espécies, o exame cultural não é o mais indicado pelo fato de apresentar uma sensibilidade insuficiente uma vez que o material coletado pode não apresentar o número suficiente de unidades formadoras de colônia (ASCIOGLU *et al.*, 2002; KAWAZU *et al.*, 2003).

Estudos concluem que nas amostras obtidas por broncoscopia (aspirados, lavado brônquio alveolar), a positividade se situa aproximadamente em 50% (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003b). No entanto, se utilizados lavados broncoalveolares e biopsias de tecidos, os resultados podem ser melhorados, mas raramente devem ser utilizados em doentes hematológicos (leucemias, linfomas, transplantação de medula óssea, autóloga e alogênica, entre outros), devido à natureza invasiva do processo e à gravidade do seu estado (LATGE, 1999; PAZOS;DEL PALACIO, 2003).

De acordo com os dados apresentado, técnicas microbiológicas/micológicas tradicionais, visando a observação direta e a cultura da expectoração, apresentam baixa sensibilidade (15 a 20%) (PAZOS;DEL PALACIO, 2003). Assim, para o diagnóstico de aspergilose invasiva, o aparecimento de uma única cultura positiva resulta num diagnóstico pouco provável. Por outro lado, assim como nos diagnósticos por PCR, o aparecimento de culturas de espécies de *Aspergillus* nem sempre refletem doença invasiva,

uma vez que, pode ocorrer colonização em doentes imunocomprometidos, e resultados falsos positivos provenientes de contaminação ambiental (ASCIOGLU *et al.*, 2002).

Nos doentes com doença hematológica de origem oncológica, e, nos que apresentam elevado risco de vir a desenvolver aspergilose invasiva, a existência de hemoculturas positivas para espécies de *Aspergillus* associadas a provável ou verdadeira aspergilemia, aparecem tardiamente, por vezes apenas um dia antes da morte, ou então, são evidenciadas por autópsia (DEL PALACIO; CUETARA; PONTON, 2003b; KONTOYIANNIS *et al.*, 2005).

2.5.2 Métodos por Imagem

A tomografia computadorizada do tórax fornece imagens que podem ser muito úteis para fazer um diagnóstico precoce em doentes com aspergilose. Em uma radiografia precoce, pode ser visualizado um infiltrado típico, o qual pode ser compatível com uma variedade de causas infecciosas ou não infecciosas (STEVENS, 2002). No entanto, a radiografia, por ser um método auxiliar de diagnóstico de baixa sensibilidade e especificidade, e, por expor o doente a radiações sucessivas para a avaliação do seu estado evolutivo, impõe a necessidade da utilização de métodos mais sensíveis e mais específicos (GREENE, 2005). Os achados iniciais, obtidos por tomografia computadorizada, são de grande utilidade na identificação de estratégias de diagnóstico e terapêuticas adicionais, podendo reduzir o tempo necessário para o diagnóstico, de 6 dias para 1 dia e, assim, obter-se uma melhor resposta para a terapia (STEVENS, 2002).

2.5.3 Métodos Enzimáticos

Existem outros componentes do fungo atualmente sendo utilizados como marcadores de infecção fúngica invasiva. Dentre os mais comuns está a 1,3-beta-D-glucana, polissacarídeo presente na parede celular de leveduras e fungos filamentosos. O reagente Limulus (LAL: Limulus Amebocyte lisado), feito a partir de extrato de células do sangue do caranguejo-ferradura, tem chamado a atenção como um reagente de diagnóstico *in vitro* para aspergilose invasiva desde a descoberta recentemente que este reage com 1,3 beta-D-glucana. Quando uma amostra pré-tratada é misturada com a solução de LAL, a 1,3-beta-D-glucana presente na amostra, ativa o fator G, que inicia as reações em cascata, e causa gelificação. O fator G da coagulação, funciona como detector sensível e natural (MIYAZAKI *et al.*, 1995). É capaz de detectar candidose invasiva, aspergilose invasiva e infecções causadas por *Fusarium*, *Saccharomyces*, *Trichosporom*, *Acremonium* (KOHNO *et al.*, 1993). Este método já se encontra disponível na forma de kits comerciais, porém, devido a baixa especificidade, não é muito difundido.

2.5.4 Métodos Imunológicos

Como alternativa a estes métodos, novas ferramentas para o diagnóstico de aspergilose foram propostos, por exemplo, imunoensaios para a detecção de galactomananas (LATGE *et al.*, 1994; MENNINK-KERSTEN;DONNELLY;VERWEIJ, 2004; WHEAT;WALSH, 2008). Atualmente estão disponíveis no mercado kits de ELISA, para detecção de galactomananas utilizando anticorpos monoclonais de ratos. Galactomananas são polissacarídeos de parede celular encontradas em várias espécies do gênero *Aspergillus* que são liberados na circulação sanguínea após a infecção (BAHIA *et al.*, 1997; MENNINK-KERSTEN;DONNELLY;VERWEIJ, 2004). Portanto, o surgimento de

galactomananas na corrente sanguínea está relacionado com a infecção fúngica invasiva (PATTERSON *et al.*, 1988), sendo assim, pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico e para monitorar a resposta ao tratamento (MAERTENS *et al.*, 2001). Ensaio com o kit de ELISA utilizando soro humano apresentaram limite de detecção de aproximadamente 1ng/mL para o polissacarídeo (HOPWOOD *et al.*, 1995). Apesar de resultados bastante promissores, estudos avaliando os ensaios de quantificação de galactomananas para diagnóstico de aspergilose invasiva revelaram altas taxas de resultados falso-positivo (cerca de 83%) em pacientes pediátricos e neonatos, possivelmente relacionados com a reação cruzada com *Bifidobacterium bifidum* (MENNINK-KERSTEN;DONNELLY;VERWEIJ, 2004). Danos no endotélio intestinal podem aumentar a quantidade de galactomananas absorvidas pela dieta (LESCHER-BRU V., 1998). A porcentagem de falsos positivos é maior nos primeiros 30 dias após o transplante de medula óssea e 10 dias após o início de quimioterapia citotóxica (SWANINK *et al.*, 1997), justamente nos períodos mais críticos para que ocorra a infecção e por isso mais importantes para o diagnóstico.

A utilização de galactomananas para o monitoramento de pacientes com câncer em que não se sabia da infecção fúngica as taxas de sensibilidade foram de apenas 29%, e quando o estudo foi realizado com pacientes em que a aspergilose invasiva tinha sido diagnosticada anteriormente, esta apresentou taxa de 64% (HERBRECHT;LETSCHER-BRU *et al.*, 2002). Quando o teste foi aplicado a outros grupos de risco a sensibilidade também foi baixa, apresentando valores de 60% em pacientes transplantados de medula óssea, 30% em transplantados de pulmão (HUSAIN *et al.*, 2008) e 56% em transplantados de fígado (MACHETTI *et al.*, 1998).

Já foi relatada também reação cruzada com *Penicillium spp.* (SWANINK *et al.*, 1997), *Paecilomyces variotii* e *Alternaria spp.* (HERBRECHT;DENNING *et al.*, 2002). Outros fatores como, a utilização de drogas de origem fúngica como antibióticos, também podem prejudicar a seletividade do método. Associações como ampicilina/sulbactam (ANSORG;VAN DEN BOOM;RATH, 1997), amoxicilina/ácido clavulânico (MATTEI *et al.*, 2004), piperacilina/tazobactam (VISCOLI *et al.*, 2004; MACHETTI *et al.*, 2006) podem gerar resultados falso-positivos. O uso profilático de antifúngicos pode diminuir os níveis de antígeno

pela diminuição da carga fúngica, diminuindo a sensibilidade do ensaio (MARR;PATTERSON;DENNING, 2002). Portanto, o método de ELISA não é recomendado como método diagnóstico exclusivo de rotina para aspergilose invasiva. Em amostras de urina as quantidades de galactomananas detectadas são ainda menores, dificultando a utilização desta matriz para diagnóstico precoce (STYNEN *et al.*, 1995).

2.5.5 Métodos por Biologia Molecular

Métodos utilizando biologia molecular vêm sendo desenvolvidos visando o diagnóstico de infecções fúngicas invasivas. A sensibilidade, no que se refere à determinação do DNA por técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é bastante elevada, sendo aproximadamente vinte vezes mais sensível do que a cultura. Por este método, podem ser detectados de 1 a 10 fg de DNA fúngico ou de 1 a 5 unidades formadoras de colônias por mL.

As técnicas de Biologia Molecular que utilizam PCR podem ser muito úteis no diagnóstico precoce, bem como, na ajuda da monitorização do tratamento antifúngico (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003b; LIU *et al.*, 2005). O método utilizando a PCR mostrou-se 19 vezes mais sensível que a cultura para detecção de *Aspergillus fumigatus* (ALEXANDER, 2002), com valores de sensibilidade variando entre 79% a 100% e especificidade entre 81% a 93%, dependendo da metodologia utilizada (BUCHHEIDT *et al.*, 2001; KAMI *et al.*, 2001; HEBART *et al.*, 2002). Não existem kits comerciais disponíveis e a metodologia continua não padronizada (PASQUALOTTO;DENNING, 2005).

Esta técnica utiliza outro marcador biológico possível para o diagnóstico da aspergilose invasiva, o material genético do fungo (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003b; MILLON *et al.*, 2005). Mesmo se tratando de uma técnica bastante específica e sensível não é possível diferenciar o portador de *Aspergillus* sp. do paciente que realmente apresenta a aspergilose. Em função disso, a frequência de resultados falso positivos é bastante elevada

para esse método (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003b; KAWAZU *et al.*, 2003). Sabe-se que 25% da população saudável apresenta PCR positivo para *Aspergillus* em amostras do trato respiratório, o que poderá ser solucionado se for realizada a quantificação da carga fúngica mediante a realização de PCR em tempo-real (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003a; b), porém, aumentando consideravelmente seu custo.

A amostra ideal é o sangue (total, soro, plasma), preferencialmente o sangue total sem anticoagulante, já que a sensibilidade na técnica de PCR efetuada no plasma é menor. Se utilizarmos sangue total de doentes com aspergilose invasiva declarada, a sensibilidade da técnica, quando são estudadas duas ou mais amostras, sobe para 100% (DEL PALACIO;CUETARA;PONTON, 2003a).

O consenso internacional que define Infecção Fúngica Invasiva nos doentes onco-hematológicos não inclui a técnica de PCR como um instrumento de diagnóstico, em virtude de resultados não concordantes (ASCIOGLU *et al.*, 2002; KAWAZU *et al.*, 2003; MILLON *et al.*, 2005). Embora existam inúmeros esforços dirigidos para a detecção do DNA de *Aspergillus spp.*, a falta de técnicas padronizadas bem como o pouco conhecimento da cinética de liberação do DNA, continuam a impedir a aplicabilidade desta técnica em larga escala (HOPE;WALSH;DENNING, 2005).

2.5.6 Novos Métodos

Além dos métodos descritos, novos métodos têm sido desenvolvidos para diagnóstico de aspergilose invasiva, como, por exemplo, a detecção de gliotoxinas utilizando Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (PURI;AHMAD;PANDA, 2009), entretanto trata-se de uma técnica de baixa sensibilidade e seletividade. Ainda neste contexto, existe apenas um trabalho na literatura utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) para detecção de gliotoxina em plasma de camundongos (LEWIS *et*

al., 2005), porém, o enfoque está na parte clínica, não sendo reportado dados relativos ao método analítico. Nesse sentido, surge a necessidade da utilização de novas tecnologias, capazes de proporcionar resultados mais confiáveis necessários para o diagnóstico utilizando a gliotoxina como marcador da aspergilose.

2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu na década de 60 como a aplicação da cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para cromatografia gasosa. A principal diferença entre a Cromatografia Líquida e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência está no princípio de que a eficiência da separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária, tornando necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel (CASS;DEGANI, 2001).

Nos últimos anos, essa técnica de separação passou a ser uma das mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, e as razões para esse crescimento estão na sensibilidade e na seletividade do método, com destaques em determinações ambientais, médicas e principalmente nas indústrias farmacêuticas.

Os números são surpreendentes sendo estimados que mais de 90% dos laboratórios de análises espalhados pelo mundo utilizam pelo menos uma modalidade de CLAE em fase reversa (TONHI *et al.*, 2002).

O princípio de separação é baseado nas características físico-químicas de cada composto e uma ou mais interações entre o soluto e a fase estacionária, o que resulta numa migração pela coluna de forma seletiva. Essas interações

podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals, aos quais de acordo com sua natureza, classificam os modos de separação em cromatografia em fase reversa, cromatografia em fase normal, cromatografia de troca iônica e cromatografia por exclusão (CASS;DEGANI, 2001).

A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada e consiste em uma fase estacionária de baixa polaridade e uma fase móvel de maior polaridade enquanto que a fase normal tem as polaridades invertidas (TONHI *et al.*, 2002). A escolha do modo mais adequado de separação cromatográfica é baseada na natureza do composto, no peso molecular, na polaridade e no caráter iônico, dependendo, além disso, da fase estacionária e da fase móvel para cada classe de soluto (CASS; DEGANI, 2001).

O equipamento é composto por alguns módulos como bombas de pressão e fluxo constante, injetor de amostra, forno da coluna, detector, interface de dados e computador. Na atualidade, estes módulos são totalmente computadorizados e permitem que alguns parâmetros como temperatura da coluna, vazão de fluxo, e alteração na composição da fase móvel (eluição gradiente) sejam alterados individualmente no equipamento, sendo estes fundamentais para o desenvolvimento dos métodos analíticos. Além disso, a composição da fase estacionária é um fator de grande relevância na separação de compostos e deve ser avaliada antes do desenvolvimento do método (SNYDER;KIRKLAND;GLAJCH, 1997; CASS;DEGANI, 2001).

A temperatura do forno é um parâmetro muito importante em CLAE, pois afeta diretamente o perfil cromatográfico dos compostos. Além disso, favorece na redução do tempo de retenção principalmente de amostras ionizáveis, embora as amostras neutras também possam ter mudanças significativas na retenção. Portanto é um parâmetro muito útil para melhorar a resolução entre picos, sem haver necessidade de mudança de coluna ou da fase móvel (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A vazão de fluxo da fase móvel também é um parâmetro importante para separação de compostos em CLAE, pois, afeta diretamente o tempo de retenção dos analitos e a pressão do sistema (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A eluição por gradiente, por sua vez, é uma alternativa para melhorar a resolução e a seletividade do método, favorecendo,

adicionalmente, na separação de macromoléculas e na diminuição do tempo de corrida em amostras que contenham analitos com ampla faixa de retenção (K). As desvantagens da utilização deste sistema estão principalmente em sua maior complexidade, pois possui um maior número de variáveis, o que dificulta a reprodutibilidade dos dados (CASS; DEGANI, 2001).

Os sistemas de detecção utilizados em CLAE são os mais diversos. Alguns parâmetros como alta sensibilidade, alta seletividade, rapidez de resposta, informação qualitativa do pico desejado, linearidade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças de temperatura e composição da fase móvel caracterizam a escolha do sistema. Os mais utilizados por sua vez são o arranjo de foto diodos ou UV-Visível (mais utilizado), fluorescência, índice de refração, infravermelho, polarímetro e dicroísmo circular, eletroquímicos, espalhamento de luz (light-scattering), ressonância nuclear magnética e espectrômetro de massas (EM).

Esse último por sua vez, é ideal para a química analítica por ser universal, apresentar alta sensibilidade, fornecer massa molecular dos solutos e contribuir coma elucidação estrutural destes (CASS; DEGANI, 2001).

2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM)

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molecular de compostos eletricamente carregados por um sistema de ionização, ou íons previamente formados pela dissociação molecular induzida por colisão (COLE, 1997).

Graças à alta sensibilidade e à capacidade de identificar íons através da razão massa/carga (m/z), os espectrômetros de massas são considerados de extrema relevância para a indústria farmacêutica, pois, além de grande êxito como suporte analítico, é um dos primeiros métodos de escolha para elucidação estrutura de novas moléculas (NIESSEN, 1999; GLISH; VACHET, 2003).

Em outras áreas como na química de polímeros, análises ambientais, bioquímicas, toxicológicas, farmacológicas, biotecnológicas e, recentemente nas áreas de alimentos e perfumaria, os espectrômetros de massas vêm ganhando interesse tornando-se fundamentais como recurso para novas pesquisas. Este fato se dá principalmente pela diversidade de técnicas desenvolvidas até o presente momento, sendo a mais importante delas, a hifenação do espectrômetro de massas com o cromatógrafo líquido (CLAE-EM), ao qual tem possibilitado a análise de compostos orgânicos polares, não voláteis e termolábeis (WATSON, 1997; MAURER, 1998; MAURER *et al.*, 1998; NIESSEN, 1999; MARQUES, 2006).

Para que possamos entender o funcionamento de um espectrômetro de massas, é necessário compreendermos os três principais componentes do equipamento: a fonte de ionização, o analisador e o detector. A diferença entre esses componentes distingue os tipos de técnicas as quais independentemente da escolha, exige primeiramente que a amostra seja ionizada em uma fonte de ionização (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; GLISH; VACHET, 2003).

Diversas fontes de ionização são descritas na literatura, destacamos aqui a Ionização através de eletrospray (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), as quais permitem que sejam analisadas com qualidade uma faixa muito grande de compostos (KORFMACHER, 2005).

A técnica de ionização por ESI foi desenvolvida em 1984 por Yamashita & Fenn e na década de 90, passou a ser extensamente utilizada na análise de fármacos, metabólitos e produtos de degradação (SMYTH, 2005). Ambos, ESI e APCI, ocorrem à pressão atmosférica e utilizam alta voltagem para fornecer ionização necessária à formação de íons, aos quais podem ser detectados e quantificados nos espectrômetros de massas (KORFMACHER, 2005). Na ESI, o processo de ionização ocorre através de um capilar ao qual recebe uma diferença de potencial em relação a um contra-eletrodo de voltagens entre 500 e 4500 V, enquanto que em APCI, a ionização se dá através uma agulha a qual produz uma descarga elétrica (corona) diretamente sobre a amostra (GLISH; VACHET, 2003).

A APCI possui notáveis atributos como o fácil acoplamento ao cromatógrafo líquido e a baixa susceptibilidade a interferência de matrizes que contenham sal. Além de tudo, possui capacidade de ionizar rapidamente

moléculas pouco polares sendo muito utilizada para o monitoramento de drogas e metabólitos de origem humana e animal. A desvantagem da técnica está em amostras termolábeis devido à possível decomposição originada pelas altas temperaturas na fonte. Além disso, alguns solventes podem suprimir completamente a formação dos íons de interesse (VAN BRAMER, 1997; MAURER, 1998).

A ESI, por sua vez, é considerado o mais robusto dos processos de ionização, sendo ainda, o mais utilizado em laboratórios clínicos. Este tipo de fonte é um processo de ionização brando, ao qual mantém intacta a molécula precursora com uma ou múltiplas cargas carregadas positivamente ou negativamente de acordo com o sistema dado ao capilar de ionização da amostra. Além disto, este sistema trabalha muito bem com mistura de solventes aquosos e orgânicos sendo, portanto, o mais apropriado para a hifenação com o cromatógrafo líquido em análises quantitativas analíticas e bioanalíticas. Outra grande vantagem desta técnica está na ampla faixa de tamanho das moléculas que podem ser ionizadas, o que possibilita o estudo de proteínas e de complexos multimoleculares. Adicionalmente, ESI é uma técnica rápida, sensível, capaz de investigar matrizes complexas com alta sensibilidade e ainda, com vantagem na análise de compostos termicamente sensíveis, o que justifica seu amplo uso (VAN BRAMER, 1997; DOOLEY, 2003; GLISH; VACHET, 2003; NIESSEN, 2003). Como qualquer técnica de ionização, ESI também possui deficiências como a necessidade de fluxo constante da amostra (o que ocasiona certo desperdício), além da dificuldade com o efeito de supressão iônica em matrizes que contenham concentrações elevada de sal (GLISH; VACHET, 2003).

Tais como as fontes de ionização, diversos também são os tipos de analisadores os quais tem a finalidade de separar os íons de acordo com a sua razão massa carga (m/z) e transmiti-los até o detector. A escolha do melhor tipo de analisador depende da resolução desejada, do intervalo de massas a ser analisado e do limite de detecção para cada aplicação (VAN BRAMER, 1997).

Na atualidade existem cinco principais analisadores de massas os quais são divididos em dois grupos: analisadores de transmissão e os de captura. Nos analisadores de transmissão, os íons deixam a fonte de ionização e são transmitidos até o detector através de um campo eletromagnético. Nos

analisadores de captura, os íons são armazenados dentro do analisador através de um campo eletromagnético onde podem ser avaliados ou injetados para outra fonte externa de íons (VAN BRAMER, 1997; GLISH; VACHET, 2003).

São exemplos de analisadores de captura o Tempo de Vôo (TOF), ao qual possui grande capacidade de obter espectros de massas de alta resolução, alta eficiência de transmissão e rapidez na obtenção de espectros; Captura de Íons (*Ion Trap*), considerado relativamente barato, rápido e sensível com capacidade de fornecer dados importantes para elucidação estrutural de moléculas; e a Ressonância Ciclotrônica de Íons (ICR) utilizada em pesquisas altamente especializadas devido a sua alta performance na exatidão, sensibilidade e resolução. Como exemplos de analisadores de transmissão, o mais comum é o quadrupolo simples o qual fornece o espectro de massas de cada pico cromatográfico eluído de um cromatógrafo líquido (KORFMACHER, 2005). Outro exemplo deste grupo é o triplo quadrupolo que, embora não seja o mais comum, é o mais utilizado para doseamentos analíticos e bioanalíticos, ao qual possui, adicionalmente, fundamental importância na identificação de compostos (VAN BRAMER, 1997; KORFMACHER, 2005; CATALDI;BIANCO;ABATE, 2008). Os analisadores tipo triplo quadrupolo são relativamente baratos, compactos, rápidos e de alta eficiência de transmissão e consistem basicamente em quatro barras cilíndricas dispostas simetricamente umas das outras. Dentro do espectrômetro de massas, um campo elétrico acelera os íons para fora da fonte de ionização e para dentro dos quadrupolos. A transmissão se dá através de uma rádio frequência (RF) e uma corrente de voltagem (DC) aplicada aos eletrodos a qual oscila o campo elétrico funcionando como um filtro, transmitindo até o detector somente a m/z selecionada (VAN BRAMER, 1997).

A grande vantagem desta técnica está nos recursos de análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas *in tandem* (EM-EM) a qual é muito utilizada em estudos de bioequivalência e de biodisponibilidade (CASS; DEGANI, 2001; KORFMACHER, 2005). Devido a excelência deste recurso, a espectrometria de massas teve um aumento considerável de aplicações na última década, principalmente nas áreas de bioquímica, genética, farmacologia e proteômica as quais contribuíram para aumento exponencial de publicações da literatura médica e da química clínica (DOOLEY, 2003).

O analisador do tipo triplo quadrupolo possui dois sistemas seletivos de filtros de massas os quais são dispostos em série sequenciais. Íons de particular massa/carga (precursores) são selecionados em um primeiro filtro de massas sendo direcionados para uma câmara ou cela de colisão, onde colidem com um gás inerte formando íons fragmentos (Figura 2). Isto aumenta significativamente a especificidade da detecção de uma determinada molécula, pois os fragmentos dos íons formados são característicos para cada composto, o que permite definir adicionalmente, a classe de cada molécula precursora, uma vez que os íons fragmentos são característicos de cada composto (DOOLEY, 2003). Após a passagem dos íons pelo analisador estes são transmitidos até o detector, gerando um sinal através da formação de elétrons secundários que são amplificados, ou induzindo uma corrente gerada por uma carga móvel. Vários tipos de detectores para espectrômetros de massas estão disponíveis no mercado sendo o mais comum o multiplicador de elétrons. Os critérios mais importantes que distinguem diferentes tipos de detecção de íons são a sensibilidade, a precisão e o tempo de resposta. Um multiplicador de elétrons, por exemplo, apresenta resposta rápida em sistemas acoplados a cromatografia, permitindo varreduras de massas de 50-500 Da em 0,1 segundo (SIUZDAK *et al.*, 1996).

Além dos espectrômetros mencionados, outros tipos são encontrados no mercado incluindo os sistemas híbridos. Estes combinam dois ou mais tipos de analisadores tornando o sistema altamente especializado de acordo com a necessidade do usuário (LOBODA *et al.*, 2000; KORFMACHER, 2005; CATALDI;BIANCO;ABATE, 2008).

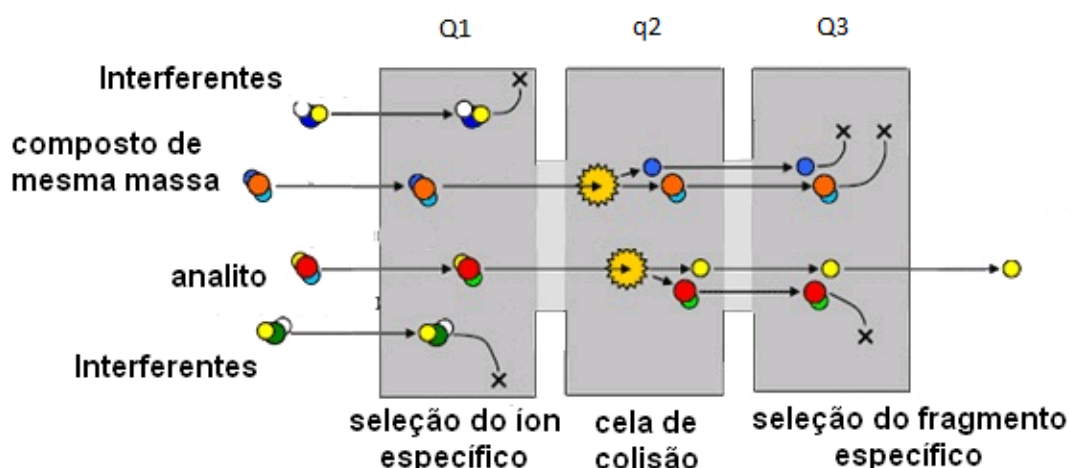


FIGURA 2 - ESQUEMA GERAL DE UM ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.

2.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS POR CLAE-EM/EM

Na atualidade, os métodos seletivos e sensíveis têm sido fundamentais para a avaliação quantitativa de drogas e seus metabólitos em estudos farmacológicos, pré-clínicos e/ou biofarmacêuticos (FDA, 2001). Neste contexto, a hifenação do espectrômetro de massas com o cromatógrafo líquido (CLAE-EM/EM) se tornou a técnica mais utilizada (SHAH, 2007), pois atende a esses requisitos com a vantagem adicional de requerer um pré-tratamento mínimo da amostra, e possibilitar a análise de substâncias de diferentes polaridades (WAL *et al.*, 2010).

Apesar das vantagens, algumas etapas devem ser seguidas para o desenvolvimento de um método quantitativo por CLAE-EM/EM, sendo o primeiro requisito conhecer as características da amostra e do analito de interesse (massa molecular, polaridade, característica iônica, pKa e solubilidade). Esta etapa é de fundamental importância, pois cada método é específico para um dado analito (WAL *et al.*, 2010).

A segunda etapa é a escolha do meio de onde o analito será extraído (sangue ou urina). Essa etapa depende da natureza da molécula e da estimativa de concentração no fluido biológico. A partir de então as otimizações cromatográficas (fase móvel, coluna, pH do meio e temperatura) e do

espectrômetro de massas (ionização e analisador) podem ser realizadas (WAL *et al.*, 2010).

Todas essas etapas são de grande relevância para que resultados confiáveis sejam alcançados (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). Porém, o preparo da amostra tem possivelmente o maior papel na análise real, isso porque a complexidade de uma matriz biológica torna frequentemente a análise direta impossível (CIOLA, 1998).

Essa etapa contrasta e muito com as técnicas analíticas modernas, pois, enquanto as análises cromatográficas são realizadas de modo ultra-rápido, o preparo de amostras, em sua maioria, exige um tempo muito grande de execução (CIOLA, 1998; NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009).

Na tentativa de minimizar a laboriosidade dessa etapa, técnicas modernas e automatizadas de preparação de amostras têm sido desenvolvidas, principalmente as microextrações (FLANAGAN *et al.*, 2006; NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). Mas apesar dos esforços realizados, até o presente momento a preparação convencional de amostras ainda é a mais utilizada graças a sua consagração nas rotinas de laboratórios (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). Aqui podemos citar a extração em fase sólida, extração líquido-líquido e a precipitação de proteínas por meio de uso de solventes orgânicos. As vantagens e desvantagens de cada técnica serão melhores discutidas a seguir.

2.8 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

2.8.1 Extração por Precipitação de Proteínas

O método de extração através da precipitação de proteínas é utilizado tradicionalmente no tratamento de amostras de soro ou plasma (FLANAGAN *et al.*, 2006; NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). Este consiste na adição de solventes

orgânicos à amostra, a qual é submetida a agitação e, em seguida, centrifugada. O sobrenadante pode então ser analisado diretamente, ou até mesmo sofrer uma segunda purificação, dependendo do nível de proteínas remanescente na solução (FLANAGAN *et al.*, 2006).

Como esta técnica exige poucas etapas para ser consolidada, é considerada a mais simples, barata e rápida de ser executada considerando as demais técnicas convencionais de preparo de amostras. Além disso, tem como vantagem a possibilidade de extrair compostos com diferentes polaridades (MA *et al.*, 2008). Mesmo com tantas vantagens, a eficiência deste procedimento é bastante discutida na literatura (FLANAGAN *et al.*, 2006), pois o extrato (sobrenadante) contém uma grande quantidade de componentes remanescentes do plasma, e isto pode diminuir a seletividade do método. Outro fator importante a ser considerado e passível de ocorrência, é a co-precipitação do analito de interesse, sendo que o uso desta técnica pode adicionalmente promover supressão de sinal no espectrômetro de massas (MA *et al.*, 2008). É importante mencionar que se reagentes ácidos são utilizados para aumentar a eficiência da precipitação, o analito e o padrão interno devem ser estáveis em baixo pH, e como citado anteriormente, muitas vezes é necessário o uso de uma segunda porção do reagente de precipitação para a efetivação da purificação da amostra. Outras vezes, o uso de filtros é necessário, porém pode ocasionar a perda do analito (FLANAGAN *et al.*, 2006).

Apesar dos problemas descritos, a precipitação por proteínas continua sendo bastante utilizada em ensaios bioanalíticos, pois esta é sem dúvida a técnica mais simples de extração para este tipo de análise (FLANAGAN *et al.*, 2006). Sua aplicação permanece em grande parte dos laboratórios, e publicações recentes descrevem seu uso em sistemas totalmente automatizados com desejada precisão e exatidão (YANG *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2008; WEN *et al.*, 2008).

2.8.2 Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas para o tratamento de amostras biológicas, e até hoje seu uso é bastante popular no que tange as etapas de preparação e pré-concentração de amostras (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). A técnica é baseada no particionamento da amostra entre líquidos de duas fases imiscíveis, onde uma das fases é aquosa e outra um solvente orgânico (WAL *et al.*, 2010).

Nesta técnica, os compostos mais hidrofílicos preferem a fase aquosa enquanto que os hidrofóbicos a fase orgânica. Dessa forma, os analitos extraídos pela fase orgânica são facilmente recuperados através da evaporação do solvente, enquanto que os remanescentes da fase aquosa podem ser injetados diretamente no CLAE, dependendo da matriz na qual se encontra o analito (WAL *et al.*, 2010). Apesar disso, alguns autores afirmam que a técnica é inadequada para recuperação de compostos hidrofílicos (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009).

Este tipo de extração tem a vantagem de ser bastante simples, mas algumas desvantagens como a formação de emulsão dificultam seu uso. Adicionalmente, uma quantidade relativamente grande de solventes orgânicos (muitas vezes tóxicos) é utilizada, o que a torna a técnica prejudicial para o meio ambiente (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). Em relação a custos, a literatura é controversa, e apesar das inconveniências citadas, a técnica é amplamente utilizada em ensaios bioanalíticos – dada sua rapidez e capacidade de recuperação dos mais diferentes compostos de forma mais específica, quando compara à técnica de extração por precipitação de proteínas (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009; WAL *et al.*, 2010). Além disso, esta técnica permite evaporar o extraído e reconstituí-lo em pequenos volumes (WAL *et al.*, 2010), sendo que sistemas semi ou totalmente automatizados já são uma realidade no mercado (KATAOKA, 2003; NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009).

2.8.3 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma das técnicas de tratamento de amostras mais desenvolvidas e populares em bioanálises, fato esse atribuído à sua grande efetividade e seletividade no pré-tratamento de matrizes complexas (BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004; WAL *et al.*, 2010).

Nessa técnica, o analito de interesse é particionado entre uma fase líquida (amostra) e uma fase estacionária, em geral adsorventes à base de sílica, fases quimicamente ligadas à sílica, polímeros e seus derivados (CIOLA, 1998; KATAOKA, 2003). Os dispositivos são disponibilizados na forma de seringas (CIOLA, 1998; KATAOKA, 2003) e pipetas contendo suporte para fase estacionária - também conhecida como pipeta de extração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Na EFS a substância de interesse é eluída por uma fase estacionária sólida, e de acordo com o grau de afinidade por essa fase, fica retida. A partir de então os interferentes podem ser eluídos ou lavados, minimizando a presença de substâncias indesejadas na fração final do extrato (WAL *et al.*, 2010).

Todavia, para que a extração aconteça de forma efetiva, é necessário que o analito tenha uma afinidade maior pela fase estacionária do que pela matriz (KATAOKA, 2003), ou em outras palavras, a escolha correta do adsorvente é o ponto-chave para promover seletividade da extração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

O método exhibe algumas desvantagens como o uso de quantidade apropriada de amostra de acordo com o tipo de dispositivo, necessidade de aparato adequado e cuidados na velocidade de eluição da amostra. Além disso, os dispositivos são descartáveis e devem ser acondicionados antes do uso (CIOLA, 1998), o que torna a técnica cara e demorada (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Mesmo com estas desvantagens, este ainda é um dos procedimentos de extração mais utilizados na área de bioanálise, pois é de fácil manipulação, apresenta grande eficiência de separação e facilidade para recuperar o analito (WAL *et al.*, 2010). Além de tudo, uma grandiosidade de adsorventes com

diferentes afinidades são disponibilizados comercialmente (BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004), sendo que o sistema utiliza pouco solvente orgânico (comparado com extração líquido-líquido), é efetivo na pré-concentração da amostra, não forma emulsão, e conta com a possibilidade de automação (KATAOKA, 2003). Logo, essa técnica é considerada a mais efetiva em rotinas que utilizem matrizes de alta complexidade (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Importante mencionar, que independente da técnica de extração escolhida, esta deve ser otimizada de acordo com o método proposto. Além disso, para cada caso deve-se levar em consideração o tempo de extração, a seletividade, o número de etapas, e o consumo de solvente (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Após a escolha da técnica de extração, o método desenvolvido, por fim, deve ser validado de acordo com a legislação vigente. Esta etapa é necessária a fim de demonstrar que o novo método é reprodutível e confiável para a matriz em questão. Para tanto, todos os procedimentos necessários para demonstrar a qualidade dos resultados devem ser adotados (FDA, 2001; BRASIL, 2003; WAL *et al.*, 2010; BRASIL, 2012) e alguns parâmetros de validação devem ser avaliados. As definições de cada parâmetro bem como os valores de aceitação serão discutidos a seguir.

2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Cada método tem sua particularidade e está sujeito a efeitos da matriz e as variações características de cada analito. Logo, para que a correta interpretação dos seus resultados seja alcançada, é primordial garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos sejam reprodutíveis e confiáveis (SHAH, 2007).

Todavia, otimizações não garantem o desempenho de um método, sendo necessárias ações que demonstrem sua adequabilidade (IUPAC, 1995). Assim, é essencial que os princípios de validação dos métodos bioanalíticos sejam

estabelecidos e aplicados de acordo com a orientação de órgãos regulamentadores (SHAH, 2007).

A maioria das técnicas bioanalíticas empregadas inclui, mas não se limita, à métodos cromatográficos (CG, CLAE, CG-EM e CLAE-EM), de radioimunoensaio e enzimáticos (ELISA), sendo que os princípios e procedimentos de validação são comuns para todos os métodos. Dessa forma, independente da técnica escolhida, os parâmetros de especificidade, precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade das amostras e soluções de trabalho devem ser avaliados (BRASIL, 2003; SHAH, 2007). Mais recentemente foram incluídos como parâmetros a serem avaliados o efeito matriz e efeito residual (BRASIL, 2012)

A definição destes parâmetros, bem como a faixas de aceitação e os procedimentos a serem adotados encontram-se descritos em diversos guias de validação disponíveis na literatura, sendo o principal deles o *Guidance for Industry* do *Food and Drug Administration*, empregado como documento base de orientação da indústria farmacêutica dos Estados Unidos.

No Brasil, as orientações são fornecidas através da Resolução RDC nº27, de 17 de maio de 2012 a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos no Brasil, regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que revoga a RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2012). De acordo com este órgão, a etapa de validação deve preceder a implementação de um método, e é imprescindível que todos os parâmetros sejam validados. Os parâmetros citados serão detalhados a seguir.

2.9.1 Especificidade e Seletividade

Este parâmetro é definido como a habilidade de um método analítico de medir e diferenciar o composto em estudo de outros componentes que possam estar presentes na amostra como metabólitos, impurezas, produtos de

degradação ou componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2012).

Os termos seletividade e especificidade têm sido definidos pelo ICH com o mesmo significado, porém, apesar de gerar certa confusão, deve-se utilizar apenas o termo seletividade como sugerido pela International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC e pela Association of Analytical Communities - AOAC International (VESSMAN, 1996; USP, 2007). O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO), dá uma definição mais detalhada sobre este parâmetro inferindo que um método de separação que causa resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum pode ser chamado de seletivo (INMETRO, 2003).

Para um método instrumental de separação, a seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado e deve ser continuamente monitorado durante toda a validação (RIBANI *et al.*, 2004). Em geral, os interferentes observados nas análises biológicas são os componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de degradação e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo.

Para realizar o ensaio de seletividade, amostras de plasma ou soro isentas do analito de interesse devem ser obtidas de seis indivíduos, sendo quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada. As amostras devem ser analisadas sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra deve ser testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao Limite Inferior de Quantificação (LIQ) (BRASIL, 2012).

Qualquer amostra dos indivíduos que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do metabólito ou do padrão interno deve ser rejeitada. Caso uma ou mais amostras apresentarem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Permanecendo interferência significativa nas amostras do novo grupo, o método deve ser alterado visando eliminá-la (BRASIL, 2012).

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada (BRASIL, 2012).

2.9.2 Limite de Detecção

A nova norma regulamentadora, RDC nº27 de 17 de maio de 2012, (BRASIL, 2012) não exige determinação do limite de detecção (LD), porém é denominado como sendo a menor concentração de uma dada substância que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo, ou seja, a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2007; BRASIL, 2012).

Para procedimentos analíticos instrumentais que demonstram o ruído da linha de base (CLAE, CG, Espectrômetro de Massas), a determinação do LD é realizada através da relação sinal-ruído. Neste método, compara-se a medição dos sinais do composto de interesse em baixas concentrações em relação a um branco. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de duas a três vezes o ruído da linha de base podendo ainda ser expressa de acordo com a equação abaixo:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

em que: IC é a inclinação da curva de calibração e DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; USP, 2007).

2.9.3 Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) é estabelecido por meio da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. De acordo com a Resolução RDC 27 de 17 de maio de 2012, o limite de quantificação é a menor concentração na curva de calibração preparada em matriz. Não é descrito nenhuma forma de preparo desde que seja preciso e exato. A RE 899 sugere que seja determinado por meio da relação sinal/ruído (5 ou 10 vezes a altura do ruído da linha de base obtida com um branco) ou ainda, por meio da equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

O pico de resposta do analito no LIQ deve ser identificável e reproduzível com precisão de no mínimo 80% e exatidão de 80 – 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras em 3 (três) dias consecutivos (BRASIL, 2012).

2.9.4 Linearidade

A curva de calibração é definida como a relação entre a resposta do instrumento frente a concentrações conhecidas do analito (FDA, 2001; BRASIL, 2003; 2012). A validação, quanto a este parâmetro, deve garantir um máximo de precisão, exatidão e confiança nos resultados, permitindo a visualização de quais os valores de concentração possam se encontrar deslocados para um intervalo não linear de resposta (POLESELLO, 1996; USP, 2007).

Uma curva de calibração deve ser gerada para cada analito e corrida analítica, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Cada curva deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de cada controle de qualidade (CQs) contendo o padrão interno e o padrão do analito em concentrações pré-estabelecidas: controle de qualidade do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e o controle de qualidade de diluição (CQD) (BRASIL, 2012), os quais serão melhor detalhados no item 2.9.10.

A curva de calibração deve contemplar no mínimo em 6 (seis) níveis distintos de concentração, sendo que quaisquer procedimentos alternativos devem ser justificados. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados sendo recomendável o modelo matemático mais simples, geralmente o linear. Caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva.

Os critérios de aceitação da curva de calibração são:

- Desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para o LIQ;

- Desvio menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- No mínimo 75% dos padrões da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- No mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo LIQ e LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores (BRASIL, 2012).

Recomenda-se que o coeficiente de correlação linear (r) seja igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

2.9.5 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogenea, sob condições idênticas de ensaio (ICH, 2005; USP, 2007). Pode ser definido como proximidade dos resultados obtidos por repetidas determinações de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012). Este parâmetro é avaliado utilizando-se, pelo menos, 5 (cinco) níveis de concentrações (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) que contemplem a faixa de variação do procedimento analítico, sendo necessário no mínimo, 5 (cinco) replicatas para cada nível de concentração. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas em dias diferentes (precisão intercorridas) (BRASIL, 2012).

A precisão pode ser expressa em termos da característica da dispersão dos resultados, ou seja, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%)(BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; USP, 2007; BRASIL, 2012). Como valores de referência não se admitem variações superiores a 15%, exceto

para o LIQ, onde se admite valores menores ou iguais a 20%, calculados conforme a fórmula a seguir:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP (desvio padrão)} \times 100}{\text{CME (concentração média experimental)}}$$

onde, DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CME, a concentração média experimental (BRASIL, 2012).

2.9.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro ou de referência em relação ao valor encontrado experimentalmente. Este parâmetro é determinado em pelo menos 5 (cinco) níveis de concentração (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em cinco replicatas cada. Deve ser avaliado em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrida), e também em, no mínimo, três corridas analíticas em dias diferentes (exatidão inter-corridas).

A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal} \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

2.9.7 Efeito residual (*Carryover*)

O teste de efeito residual, também conhecido como *carryover*, foi incluído na lista de testes necessários para validação de métodos analíticos na última normativa publicada pela ANVISA (BRASIL, 2012), mas, devido sua importância, já era frequentemente realizado. A resolução define efeito residual como sendo o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Trata-se então, de um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte, em função de resíduos retidos na coluna cromatográfica ou em qualquer outra parte do equipamento.

Caso sejam encontrados, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI (BRASIL, 2012).

A RDC também prevê que se o efeito residual for inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas (BRASIL, 2012).

2.9.8 Efeito Matriz

Assim como o teste de efeito residual, o teste de efeito matriz não era obrigatório para validação de métodos bioanalíticos. A nova resolução define efeito matriz como efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica (BRASIL, 2012).

Este ensaio veio a substituir o já conhecido teste de recuperação que apresentava algumas limitações. Agora o objetivo principal não está apenas em

ter a melhor eficiência de extração do analito e sim extrair a menor quantidade de interferentes da matriz. Muitas vezes, o que era apresentado como um excelente sinal analítico estava mascarado por componentes da matriz. Através deste ensaio garante-se que, mesmo não obtendo a melhor recuperação, não há nenhum componente da matriz influenciando a análise.

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, as quais serão comparadas com soluções, nas mesmas concentrações. Devem ser avaliados 8 CQB e 8 CQA, sendo: 4 plasmas normais, 2 plasmas lipêmicos e 2 plasmas hemolisados para cada concentração. Essas amostras serão comparadas com as respectivas soluções, utilizando o Fator Matriz Normalizada por PI (FMN), calculado segundo a seguinte fórmula:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

O Coeficiente de variação entre todos os FMN não pode ser superior a 15% (BRASIL, 2012).

2.9.9 Recuperação

A recuperação mede o quanto o processo de extração de um método analítico é eficiente dentro de um limite de variação. Valores desejáveis de recuperação do analito e do padrão interno estão próximos a 100%, admitindo-se valores menores desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003).

A resolução 27 de maio de 2012 não exige mais que seja avaliada a recuperação para a validação de métodos bioanalíticos. O método pode ser validado independente da sua capacidade de recuperação desde que seja comprovada precisão e exatidão (BRASIL, 2012).

2.9.10 Controle de Qualidade

Os controles de qualidade utilizados em uma corrida analítica nada mais são que amostras da matriz biológica fortificadas com o analito de interesse em diferentes níveis de concentração. Essas amostras têm papel fundamental para monitorar o desempenho de um método bioanalítico, bem como para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual (BRASIL, 2003; 2012).

Recomenda-se que as amostras de CQ sejam incorporadas em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras da corrida, sempre em igual número de replicatas de cada concentração. O número de amostras de CQ a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras desconhecidas (BRASIL, 2003). Para um ensaio bioanalítico devem ser considerados:

- CQ do Limite inferior de Quantificação (CQ-LIQ): mesma concentração de LIQ, menor nível de concentração da curva analítica;
- CQ de Baixa Concentração (CQB): menor ou igual 3 x LIQ;
- CQ de Média Concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA;
- CQ de Alta Concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.
- CQ de Diluição (CQD): Amostra fortificada com concentração superior ao LSQ, deve ser analisada por meio de procedimento e proporção de diluição pré definidos e especificados (BRASIL, 2012).

2.9.11 Estudo de Estabilidade

Um dos principais problemas relativos às amostras biológicas é a instabilidade das drogas, seus metabólitos ou ainda das pró-drogas. Por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009).

Os problemas de estabilidade podem ocorrer em qualquer etapa de um procedimento analítico (NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009), mas em geral se relacionam com as condições de armazenamento, presença de enzimas, pH, anticoagulante, ciclos de descongelamento, luz, e pelas propriedades químicas da droga, da matriz e do recipiente de armazenamento(FDA, 2001; BRASIL, 2003; NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009). Portanto um estudo de estabilidade não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (FDA, 2001; BRASIL, 2003; 2012).

O teste deve reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras e sendo assim a substância de interesse deve ser avaliada durante armazenagens de curta e longa duração, após ciclos de congelamento e descongelamento, e também nas condições normais de análise(BRASIL, 2003; NOVÁKOVÁ;VLCKOVÁ, 2009; BRASIL, 2012). Os resultados devem expressar um comparativo entre amostras com diferentes períodos de armazenagem, e amostras fortificadas com soluções estoque recém-preparadas, nas mesmas concentrações.

São consideradas amostras estáveis quando não forem observados concentrações com desvios superiores a 15% quando comparadas a amostras recém preparadas, com exceção do limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual é aceitável desvio de até 20% (FDA, 2001; BRASIL, 2003; 2012).

Além da estabilidade do analito em matriz biológica, deve ser demonstrada a estabilidade do analito e do PI em solução. Para isso, no mínimo, 3 (três) amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração devem ser armazenadas por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas. As soluções serão consideradas estáveis

quando não se observar desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E SOLVENTES

Metanol e acetonitrila (ambos grau CLAE) foram adquiridos da marca Tedia (Fairfield, EUA). O ácido fórmico (AFO) (88%) foi adquirido da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda) e o formiato de amônio (99%) da Acros Organics (Nova Jersey, EUA). A água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, EUA). Os padrões analíticos de Gliotoxina e Quercetina (ambos 99%), foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). As estruturas químicas destas substâncias estão apresentadas nas Figuras 3 e 4.

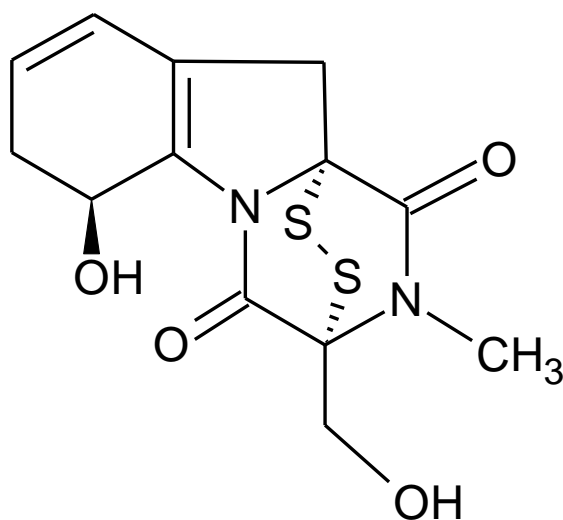


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA GLIOTOXINA.

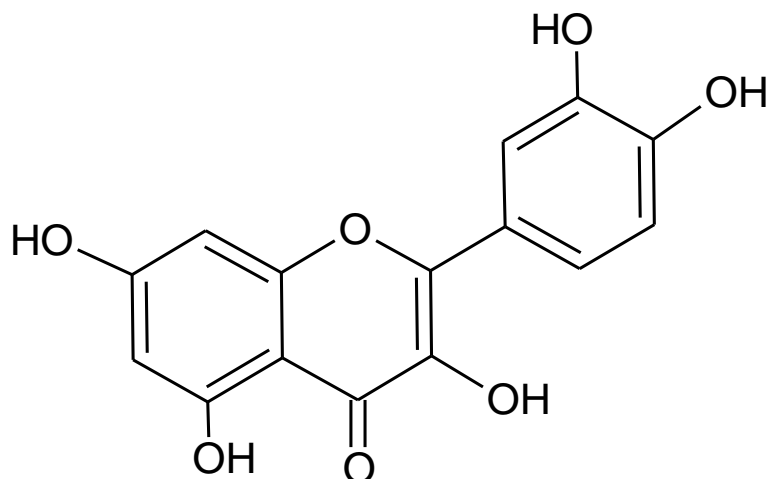


FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.

3.2 OBTENÇÃO DE PLASMA E SORO

Os plasmas branco, hemolisado e lipêmico utilizados no desenvolvimento e validação do método foram gentilmente cedidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar, Curitiba, Brasil). O soro branco foi doado por voluntários do projeto.

As amostras de soro provenientes de pacientes internados para transplante de medula óssea (TMO), pacientes submetidos a quimioterapia (QT) e pacientes internados em quarto de alto risco (QT-AR), foram cedidas pelo Hospital de Clínicas da UFPR, após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da mesma instituição (CAAE nº 10857012.0.0000.0102).

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque de gliotoxina e do padrão interno, quercetina, foram preparadas, separadamente, em metanol de modo a obter uma concentração final de 1 mg/mL. A partir das soluções estoque, soluções de trabalho foram preparadas de acordo com a necessidade de cada experimento através de diluição apropriada em acetonitrila/água (98:2 v/v). Todas as soluções foram mantidas em freezer a -40 °C.

3.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTROMETRO DE MASSAS

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canada), equipado com uma bomba seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, EUA) e uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas no modo positivo e negativo de ionização. Para realização deste experimento, soluções de trabalho foram preparadas em diferentes concentrações utilizando como diluente uma mistura acetonitrila:água (50:50 v/v), variando a proporção e concentração dos aditivos (Tabela 1) para alcançar a melhor condição de ionização do analito. Cada solução foi infundida sob fluxo de 10 µL/min em bomba seringa, utilizando a fonte de ionização ESI, operando no modo positivo e negativo de ionização. A posição do capilar foi mantida em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

TABELA 1 – DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADITIVO E PROPORÇÃO DE SOLVENTES PARA TESTE DE SOLUÇÃO DILUENTE.

Concentração de Aditivo	Proporção dos solventes (ACN:água v/v)
10 mM de formiato de amônio	70:30
5 mM de formiato de amônio	70:30
1 mM de formiato de amônio	70:30
1 mM de formiato de amônio	90:10
1 mM de formiato de amônio	98:2
1 mM de formiato de amônio + 0,5% AFO	98:2
1 mM de formiato de amônio + 0,1% AFO	98:2

Em seguida foi realizado o experimento de Multiple Reaction Monitoring (MRM). Para este ensaio a concentração dos analitos foi variada a fim de obter uma intensidade de sinal entre 2×10^5 a 1×10^6 cps. Foram otimizados automaticamente os parâmetros de *declustering potencial* (DP), *entrance potencial* (EP), *collision cell entrance potencial* (CEP), *collision energy* (CE) e *cell exit potencial* (CXP), para obtenção de dois íons fragmentos de maior intensidade para a gliotoxina e para quercetina, separadamente.

A próxima etapa foi a realização da análise por injeção em fluxo (FIA). Essa etapa consistiu no acoplamento do cromatógrafo líquido ao espectrômetro de massas para otimização dos seguintes parâmetros: *curtain gas* (CUR), *collisionally activated dissociation* (CAD), *nebulizer gas* (GS1), *turbo gas* (GS2), *ion spray voltage* (IS) e temperatura da fonte. As análises foram realizadas sem coluna utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v). O fluxo foi mantido em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de 20 μL .

As soluções de gliotoxina e quercetina utilizadas para otimização foram preparadas nas concentrações 500 ng/mL e 150 ng/mL, respectivamente.

3.5 OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por CLAE foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de uma bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, EUA), que durante as análises foi mantido a 4 °C. Acetonitrila e metanol foram utilizados como solvente de limpeza. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram tratados através do software Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

Para escolha da fase móvel foram analisadas acetonitrila, metanol e água em diferentes proporções. A fase móvel foi eluída em modo gradiente. Várias condições foram avaliadas para otimização da separação. Foram testados como aditivos para ionização o formiato de amônio e o ácido fórmico em diferentes concentrações, variando entre 0,5 a 10 mM de formiato e de 0,05 a 0,5% de ácido fórmico.

A coluna disponibilizada para este estudo foi a X-Bridge Shield RP18 (150 x 2.1 mm), 5 µm de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna XBridge RP18 (10 x 2.1 mm), 5 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Mildford, EUA). Diferentes temperaturas da coluna, volumes de injeção e fluxo também foram testados.

3.6 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA GLIOTOXINA DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO

Foram avaliados diferentes procedimentos de extração em plasma para melhor recuperação dos analitos, incluindo precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Para a condução dos ensaios, alíquotas de 200 μL de plasma branco (plasma livre dos analitos) foram inicialmente transferidas para tubos plásticos de 2 mL (tipo *Eppendorf*). Em seguida, as amostras foram fortificadas com 50 μL de padrão interno e 50 μL do padrão de gliotoxina, de modo a obter as concentrações de 50 e 250 ng/mL, respectivamente.

Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 3 min., e por fim extraídas de acordo com os seguintes procedimentos:

Precipitação de proteínas: Uma alíquota de 1,2 mL de acetonitrila foi adicionada a tubo plástico contendo a amostra fortificada. A amostra foi agitada em vórtex por 3 min. e, em seguida, submetida à centrifugação por 10 min., a 14000 rpm, a 25 °C (*Eppendorf 5810R*, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico, e levado a um concentrador de amostras para evaporação (*CentriVap Labconco*, Kansas City, EUA). O resíduo remanescente foi ressuspensionado com 200 μL de acetonitrila/água (98:2 v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico (AFO) mediante agitação em vórtex por 3 min..

Extração em fase sólida: A amostra fortificada e homogeneizada foi transferida para um cartucho de extração Oasis HLB (*Waters Corporation*, Mildford, EUA) previamente acondicionado com 2 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. A amostra foi eluída, e a coluna lavada com 2 mL de água ultrapura. A recuperação dos analitos foi realizada com 1 mL de acetonitrila. O eluato foi evaporado nas mesmas condições previamente descritas, e o resíduo remanescente foi por fim ressuspensionado com 200 μL de acetonitrila/água (98:2 v/v) contendo 0,1% ácido fórmico, mediante agitação em vórtex por 3 min.

Extração líquido-líquido: Inicialmente foram testados solventes de baixa a alta constante dielétrica, partindo do n-hexano (1,88) à acetonitrila (37,5), conforme a Tabela 2, p.68. Também foram utilizadas como extratores misturas de

solventes com objetivo de obter polaridades intermediárias e contribuir para extração da gliotoxina. As proporções testadas encontram-se descritas na Tabela 3, p.69.

Para o preparo, alíquotas de 1,2 mL dos diferentes solventes de extração foram adicionadas a tubos contendo as amostras fortificadas e homogeneizadas. As amostras foram submetidas a agitação em vórtex por 3 min. e, em seguida, centrifugadas por 10 min., a 14000 rpm, a 25 °C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi retirada, transferida para um novo tubo plástico, e levada para evaporação em um concentrador de amostras (25 °C). O resíduo remanescente foi por fim ressuspendido com 200 µL de acetonitrila/água (98:2 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, mediante agitação em vórtex por 3 min.

Os métodos de extração e a eficiência dos solventes utilizados foram comparados e avaliados de acordo com a área dos picos obtidos através de cada procedimento.

TABELA 2 – VALORES DE CONSTANTE DIELÉTRICA DOS SOLVENTES TESTADOS PARA EXTRAÇÃO.

Solventes	Constante dielétrica
Hexano	1,88
Tolueno	2,38
Éter etílico	4,33
Clorofórmio	4,81
Acetato de etila	6,02
Ácido Trifluoracético	8,55
Diclorometano	8,93
Dicloroetileno	10,36
Acetona	20,70
Metanol	32,70
Acetonitrila	37,50

TABELA 3 – PROPORÇÃO DE SOLVENTES UTILIZADOS PARA TESTE DE EXTRAÇÃO.

Solventes	Proporção (v/v)
Éter sonicado	100
Éter etílico	100
Acetato de etila	100
Diclorometano	100
Dicloroetano	100
Éter di-isopropílico	100
Éter etílico:Acetona	95:5
Éter etílico:Diclorometano	85:15
Éter etílico:Diclorometano	50:50
Éter etílico:Acetato de etila	50:50
Éter etílico:Acetato de etila	70:30
Éter Etílico: Ácido Trifluoracético	50:50
Acetona:Tolueno	70:30

3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Tendo estabelecido as condições de extração da gliotoxina e do PI da matriz, partiu-se para o preparo de amostras para o desenvolvimento e validação do método analítico. Para isso as amostras de plasma foram preparadas como segue:

Uma alíquota de 200 µL de plasma branco, descongelado a temperatura ambiente, foi fortificada com solução de trabalho de gliotoxina (50 µL), nas concentrações adequadas a obter os níveis da curva de calibração (Tabela 4) e dos controles (Tabela 5, p.71). Adicionalmente, 50 µL da solução de trabalho de quercetina (PI) foram adicionados de modo a obter uma concentração final 5 ng/mL em plasma.

TABELA 4 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

Analito	Nível	Concentração (ng/mL)
Gliotoxina	1	10,0
	2	20,0
	3	40,0
	4	60,0
	5	80,0
	6	100,0
	7	120,0
Quercetina (PI)	-	5,0

Dados: PI: padrão interno.

TABELA 5 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE.

Compostos	Nível de concentração das amostras de controle de qualidade	Concentração (ng/mL)
Gliotoxina	CQ-LIQ	10,0
	CQB	30,0
	CQM	70,0
	CQA	110,0
	CQD	70,0
Quercetina (PI)	-	5,0

Dados: CQ-LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; CQD: Controle de qualidade de diluição; PI: padrão interno.

As amostras fortificadas foram agitadas por 3 min. em vórtex e, em seguida, uma alíquota de 1,2 mL de uma mistura de éter etílico e acetato de etila (50:50 v/v) foi adicionada ao tubo. As amostras foram novamente agitadas em vórtex (3 min.), e então centrifugadas por 10 min. (14.000 rpm, 25 °C). Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico tipo eppendorff e o solvente foi evaporado em concentrador de amostras (25 °C). O resíduo remanescente foi ressuspendido com 200 µL de acetonitrila/água (98:2 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, mediante agitação em vórtex por 3 min, para então serem analisadas por CLAE-EM/EM.

O preparo das amostras Controle de Qualidade de Diluição (CQD) seguiu outro procedimento. As alíquotas de plasma branco (200 µL cada) foram fortificadas com 50 µL da solução padrão de gliotoxina e 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter as concentrações 700 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente. Em seguida, as amostras foram diluídas com plasma branco (1:10 v/v). Essa mistura é novamente alíquotada em 200 µL, adicionados 100 µL de solução diluente e então extraídas e processadas conforme descrito anteriormente.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método por CLAE-EM/EM foi validado de acordo com os critérios estabelecidos na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. De acordo com essa resolução, para que um método bioanalítico seja considerado adequado, deve atender aos requisitos de seletividade, linearidade (curva de calibração), precisão (intra e intercorrida), exatidão (intra e intercorrida), efeito matriz, efeito residual e estabilidade das amostras e das soluções (BRASIL, 2012)

3.8.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através do método da comparação das matrizes, no qual alíquotas de plasma normal, lipêmico, hemolisado e soro normal, isentas dos analitos de interesse, foram comparadas a uma matriz de plasma normal fortificada com gliotoxina e PI, em concentração correspondente ao limite inferior de quantificação (LIQ).

Para a realização deste ensaio, 100 µL de acetonitrila/água (98:2 v/v) foram adicionados a 200 µL de cada alíquota de plasma isenta dos analitos de interesse. A mistura foi agitada em vórtex por 3 min. e extraídas com a mistura acetato de etila/ éter etílico (50:50 v/v), conforme descrito no item 3.7, p 81. O sobrenadante foi evaporado e o remanescente foi ressuspensionado com 200 µL de acetonitrila/água/ácido fórmico (98:2:0,1 v/v/v) para análise em CLAE-EM/EM.

Para preparo da amostra fortificada foi alíquotado 200 µL plasma branco ao qual foi adicionado 50 µL da solução de gliotoxina e 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter as concentrações de 10 ng/mL de gliotoxina e 5 ng/mL de quercetina (PI). A amostra fortificada foi homogenizada, extraídas e ressuspensionada, conforme descrito no item 3.7, p.70.

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos foram sobrepostos aos obtidos de matriz de plasma fortificada. Nenhum pico com área superior a 20% da área obtida no LIQ e 5% da área do PI deve ser observado nos respectivos tempos de retenção (BRASIL, 2012).

3.8.2 Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LIQ) foram estimados através da relação sinal/ruído. Para condução desse estudo, soluções de trabalho contendo 100 ng/mL de gliotoxina foram preparadas em triplicata, diluídas em série (acetonitrila/água/ ácido fórmico (98:2:0,1 v/v/v) e injetadas no CLAE-EM/EM até a obtenção do menor pico detectável. O LD foi estimado através da relação sinal/ruído de 3/1 enquanto que o LIQ foi estimado pela relação sinal/ruído de, pelo menos 10/1, até que precisão desejada entre as réplicas fosse alcançada (Desvio Padrão Relativo <20%).

3.8.3 Linearidade e Controles de Qualidade

A linearidade foi determinada através do método da padronização interna. As curvas de calibração foram preparadas em triplicata, em sete níveis de concentração, durante três dias consecutivos, conforme descrito no item 3.7 (Tabela 4, p.70).

As curvas de calibração foram construídas através do método dos quadrados mínimos, sendo o controle da relação entre as variáveis, e a detecção de *outliers* realizado através dos limites de confiança e predição (95% de confiança).

Para calcular as incertezas ao longo da curva de calibração foi aplicada a análise de variância de resíduos (95% de confiança). Para cada nível de concentração, o coeficiente de variação (CV%) e o desvio padrão (DP) foram calculados. A regressão linear utilizada foi $1/x$.

Para confirmar a linearidade foi calculado o CV% entre o valor obtido experimentalmente e o valor teórico. Não devem ser observadas variações superiores a 15% em relação a concentração nominal do nível da curva, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20%. Para métodos bionalíticos, é recomendável que o coeficiente de correlação (r) seja igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

As amostras de CQ foram preparadas da mesma maneira que na curva de calibração, conforme descrito no item 3.7, p.70, sendo neste caso avaliadas cinco réplicas de cada CQ (Tabela 5, p.71). O critério de aceitação da curva de calibração exige que 75% dos controles preparados apresentem desvio padrão inferior a 15% quando comparado ao valor nominal, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20% (BRASIL, 2012).

3.8.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas durante três dias consecutivos (intra e intercorrida). Para tanto, foram preparadas cinco réplicas de cada um dos controles, conforme descrito no item 3.7, p.70, de modo a obter as concentrações descritas na Tabela 5 (p. 71).

A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as concentrações de gliotoxina obtidas experimentalmente, em um mesmo nível de concentração. A exatidão foi calculada através do valor de EPR%, conforme o item 2.9.6, p.55, em cada nível de concentração. Para ambos, precisão e exatidão, são exigidos erros menores que 15%, exceto para o CQ-LIQ onde os desvios não devem exceder 20%.

3.8.5 Efeito Residual (*Carryover*)

O teste de *carryover* foi realizado com a finalidade de verificar se há arraste do analito da amostra anterior em amostras posteriores. O ensaio consistiu de injeção de uma amostra branco de plasma, seguida da injeção de uma amostra de plasma fortificado na concentração do nível mais alto da curva de calibração. Logo após a injeção da amostra fortificada foi resubmetida a mesma amostra branco de plasma, analisada anteriormente. Nenhum pico de interferência significativa (20% da área do LIQ e 5% da área do PI) deve ser observado nos cromatogramas dos brancos de plasma nos mesmos tempos de retenção dos analitos e dos padrões internos (BRASIL, 2012).

3.8.6 Efeito Matriz

Para realizar o teste de efeito matriz, foram preparadas oito réplicas em solução com a mesma concentração do CQB (30 ng/mL) e CQA (110 ng/mL).

Além das amostras em solução, foram utilizadas oito alíquotas de 200 µL de plasma, sendo quatro plasmas normais, dois lipêmicos e dois hemolisados, nas quais foram adicionadas 100 µL de acetonitrila/água (98:2 v/v), agitadas em vórtex por 3 min. e extraídas com acetato de etila:éter etílico (item 3.7, p.70). O remanescente da extração foi ressuspenso com 100 µL de acetonitrila/água/ácido fórmico (98:2:0,1 v/v/v), 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL da solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração das soluções CQB, sem que houvessem perdas no processo de extração. Da mesma forma, foram preparados 8 alíquotas de plasma fortificados após a extração com concentração equivalente ao CQA.

Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme descrito no item 2.9.8 (p. 56). O Coeficiente de Variação (CV%) entre os

FMNs relativos às amostras e suas respectivas soluções não deve apresentar valores superiores a 15% (BRASIL, 2012).

3.8.7 Recuperação

Apesar de não ser mais exigido pela legislação, foram realizados testes de recuperação para o monitoramento e avaliação do procedimento desenvolvido. Foram comparadas amostras fortificadas antes da extração e amostras fortificadas após a extração com objetivo de verificar quanto foi perdido durante o processo de preparo de amostra.

As amostras fortificadas antes da extração foram preparadas de modo a obter cinco réplicas do CQM (70 ng/mL), conforme descrito no item 3.7, p.70.

Em seguida, para preparo das cinco amostras fortificadas após a extração, em alíquotas de 200 µL de plasma branco foram adicionados 100 µL de acetonitrila/água (98:2 v/v), agitadas em vórtex por 3 min. e extraídas com a mistura éter etílico e acetato de etila (item 3.7, p.70). O remanescente da extração foi ressuspenso com 100 µL de acetonitrila/ água/ ácido fórmico (98:2:0,1 v/v/v), 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL da solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQM .

A recuperação foi estimada através do cálculo da diferença entre as áreas dos picos cromatográficos obtidos com as amostras fortificadas antes e após a extração. O resultado foi expresso em percentagem, sendo a amostra fortificada após a extração considerada 100% de recuperação.

3.8.8 Teste de Estabilidade

3.8.8.1 Estabilidade de Curta Duração, Pós-Preparativa, após Ciclos de Congelamento e Descongelo e de Longa Duração

Para realizar o teste de estabilidade de curta duração, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos e 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter as concentrações 30 e 110 ng/mL de gliotoxina, referentes ao CQB e CQA, respectivamente e 5 ng/mL de quercetina (PI). Foram preparadas 6 replicatas para cada concentração de gliotoxina.

Após a fortificação das amostras, os analitos foram extraídos com acetato de etila:éter etílico (50:50 v/v), conforme descrito no item 3.7, p.70. O sobrenadante foi evaporado e o remanescente foi ressuscitado com 200 µL de acetonitrila/água/ácido fórmico (98:2:0,1 v/v/v). A amostra ressuscitada foi mantida sobre a bancada por 8 horas, a temperatura ambiente. A estabilidade de curta duração foi avaliada por meio de um comparativo entre as áreas dos picos cromatográficos obtidas com as amostras armazenadas, e aquelas obtidas com amostras recém preparadas.

Para os testes de estabilidade pós-preparativa, após ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração também foram utilizadas 6 replicatas de CQB e CQA, para cada um dos ensaios. No entanto, o ensaio pós-preparativo avaliou a estabilidade das amostras após 24h de armazenamento no gerenciador de amostras (4 °C, vial transparente), e o teste de congelamento e descongelamento após três ciclos de congelamento e descongelamento do plasma (1 ciclo por dia, 3 dias consecutivos). A estabilidade de longa duração foi realizada somente no final do estudo, quando o plasma armazenado (-40 °C) durante 30 dias foi analisado.

3.8.8.2 Estabilidade das Soluções Estoque e de Trabalho

As soluções avaliadas foram preparadas em metanol, conforme o item 3.3 p.63. A estabilidade das soluções estoque (1 mg/mL de gliotoxina e do PI) foi avaliada após 6 horas a temperatura ambiente, 24 e 48 horas sob refrigeração (4°C) e após 30 dias de armazenamento das soluções em freezer (-40 °C). No momento das análises, as soluções estoque foram diluídas com acetonitrila/água/ácido fórmico (98:2:0,1 v/v/v), de modo a obter as concentrações 30 (CQB) e 110 ng/mL (CQA) de gliotoxina e 5 ng/mL de quercetina (PI);

As áreas dos picos cromatográficos obtidos com as soluções armazenadas foram comparadas com aquelas obtidas com soluções recém preparadas, nos mesmos níveis de concentração.

A estabilidade das soluções de trabalho foi avaliada com as soluções de trabalho na concentração de 1000 ng/mL de gliotoxina e 1000 ng/ mL de quercetina (PI), após 6 horas sobre a bancada (temperatura ambiente) e armazenadas à 4°C por 24 e 48 horas.

Tanto as soluções estoque quanto as soluções de trabalho não devem apresentar variações superiores a 10% de suas respostas quando confrontadas às respostas das soluções recém preparadas.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS

Após a validação, o método desenvolvido foi aplicado às amostras de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFPR. As amostras foram coletadas de pacientes após o transplante de medula óssea (TMO), da quimioterapia (QT) e internados em quarto de alto risco (QT-AR), todos imunossuprimidos e com suspeita de infecção oportunista. Essas amostras foram destinadas para o teste de ELISA, utilizado como método auxiliar de diagnóstico de aspergilose. O material sobressalente desse teste foi armazenado em freezer,

-40 °C, e transportado ao Centro de Estudos em Biofarmácia, localizado no campus Jardim Botânico da UFPR. Foram recebidos em média 300 µL de cada amostra. Essa quantidade foi descongelada a temperatura ambiente, aliquotada em 200 µL, fortificadas com 50 µL do padrão interno e 50 µL de solução diluente (acetonitrila/água, 98:2, v/v). A extração e análise das amostras seguiu o procedimento definido pelo método validado (ver item 3.7, p.70).

Essas amostras foram coletadas de acordo com a disponibilidade do Hospital e identificadas quanto ao sexo, procedência (TMO, QT ou QT-AR) e de acordo com o resultado do teste de ELISA para detecção de galactomananas. As amostras consideradas positivas no método imunoenzimático apresentaram resultado igual ou superior a 0,6, sendo esse valor calculado com base na reação imunoenzimática e absorção nos comprimentos de onda 450 nm e 620/630 nm.

Foram avaliadas 30 amostras no método desenvolvido, sendo 10 positivas e 20 negativas quanto à presença de galactomananas. Os resultados do método de ELISA foram estatisticamente comparados aos obtidos através do método por CLAE-EM/EM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTROMETRO DE MASSAS

Os parâmetros relativos ao espectrômetro de massas foram otimizados através de experimentos por infusão direta das soluções dos padrões de gliotoxina e PI, separadamente. Foram realizadas análises de varredura (*full scan*) para definir as concentrações dos analitos, o modo de ionização no qual fosse possível obter um sinal com intensidade adequada e assim partir para otimização dos parâmetros individualmente.

Foram avaliados os modos negativo e positivo de ionização. O modo positivo apresentou baixa intensidade de sinal e o íon relativo à gliotoxina foi encontrado na forma de aduto de sódio. O modo negativo se mostrou mais adequado para a ionização da gliotoxina, com maior intensidade do íon $[M-H]^-$ m/z 324,8, apresentando também menor quantidade de sinais interferentes, portanto foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. Definido o modo de ionização, foi realizada a seleção do aditivo e sua concentração. Como aditivo para o modo negativo de ionização, entre outros compostos, é indicado o formiato de amônio. Diferentes concentrações e mistura com o ácido fórmico foram testadas (Tabela 1, p.64). Não foram observadas diferenças significativas com o aumento da concentração do formiato, por esse motivo a menor concentração, 1 mM, foi selecionada. A mistura com o ácido fórmico 0,1% promoveu melhora no sinal analítico além de favorecer a estabilidade da gliotoxina nas amostras.

Além do aditivo, foram otimizadas as proporções de solvente orgânico e água. Foi observado que a maior quantidade de água reduz a estabilidade da gliotoxina. A porção aquosa da solução diluente foi testada até atingir o menor volume possível, sem que houvesse precipitação do formiato de amônio. Após os testes, foi definida como solução diluente para infusão a mistura acetonitrila:água 98:2, v/v contendo 1 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. O

espectro obtido utilizando as condições otimizadas pode ser observado na Figura 5, juntamente com a hipótese de fragmentação.

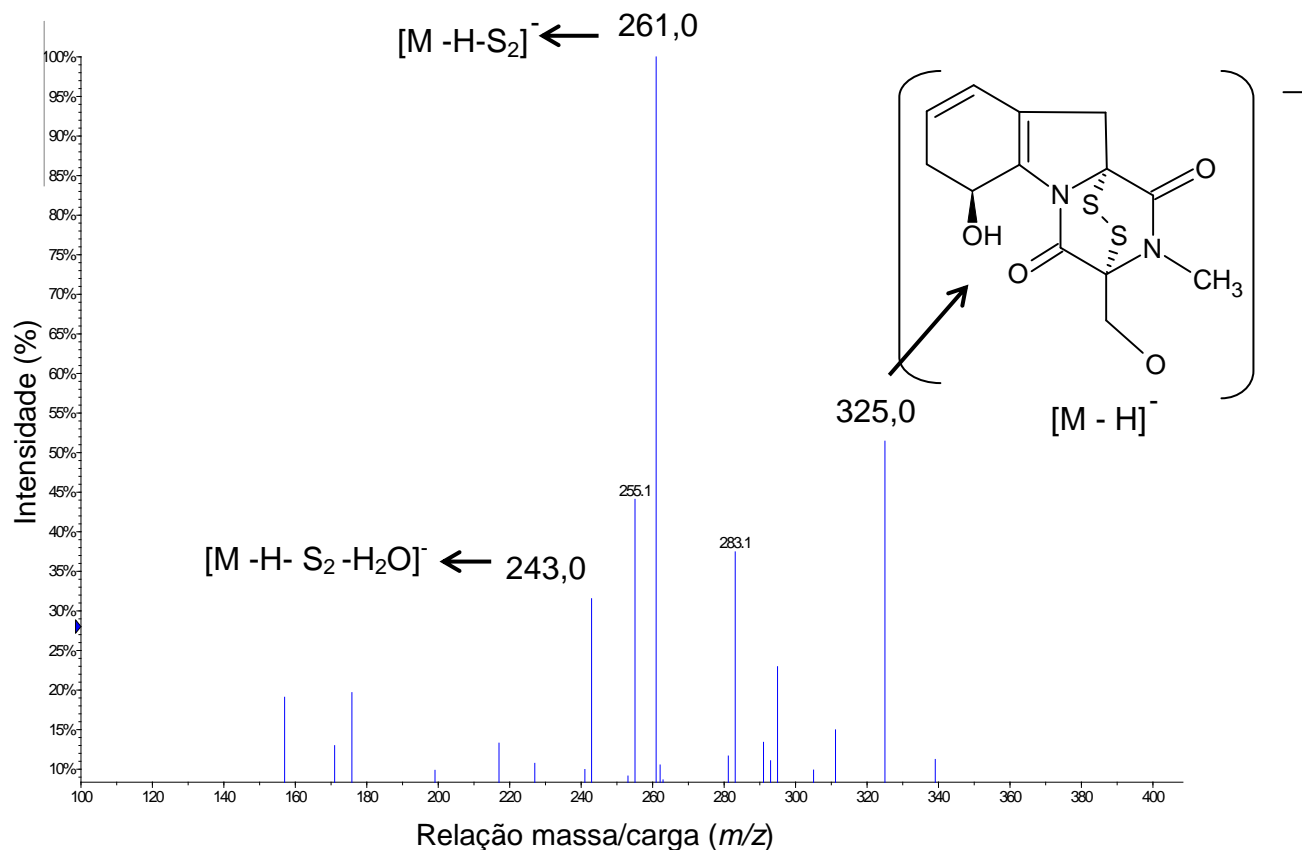


FIGURA 5 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO DE SOLUÇÃO DE GLIOTOXINA NA CONCENTRAÇÃO DE 150 ng/ mL.

Tendo definido o modo de ionização, solução diluente e verificado a intensidade do sinal do analito, partimos para otimização dos parâmetros de análise por MRM. Durante o experimento de MRM foram otimizados os parâmetros de voltagens DP, EP, CEP, CE e CXP mais adequados para a obtenção dos íons fragmentos mais estáveis dos analitos. Ao final da otimização, as transições de m/z 324,9 \rightarrow 261,2 e m/z 300,8 \rightarrow 151,0 foram selecionadas para quantificação da gliotoxina e quercetina, respectivamente. Os parâmetros otimizados para cada uma das transições estão descritos na Tabela 6 p.82.

TABELA 6 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA O MONITORAMENTO EM PLASMA DA GLIOTOXINA E QUERCETINA (PI)

Composto	Massa Molecular (Da)	Íon molecular [M – H] ⁺ (m/z)	Transições (m/z)	CE ^a (eV)	CEP ^b (V)	CXP ^c (V)	DP ^d (V)	EP ^e (V)
Gliotoxina	326,0	325,0	324,9 → 261,2*	-12	-20	-6	-20	-6
			324,9 → 243,1	-20	-20	-4	-20	-6
Quercetina	302,0	301,0	300,8 → 151,0*	-30	-16	-2	-35	-6
			300,8 → 179,0	-26	-16	-4	-35	-4

^aCE, energia de colisão; ^bCEP, potencial de entrada na cela de colisão; ^cCXP, potencial de saída da cela de colisão; ^dDP, potencial de desagrupamento; ^eEP, potencial de entrada; * transição de quantificação.

Após definição das condições do analisador, partimos para definição dos parâmetros da fonte (CUR, CAD, IS, GS1, GS2 e temperatura). Esse procedimento é realizado através da análise por infusão em fluxo (FIA), na qual ocorre o acoplamento do cromatógrafo líquido com o espectrômetro de massas, sem a presença da coluna cromatográfica. A otimização desses parâmetros permite que, mesmo com um fluxo maior, compatível com cromatografia líquida, seja possível realizar a análise em espectrômetro de massas. O fluxo utilizado para esse ensaio foi de 200 µL/min em modo de eluição isocrático. Foi utilizada como fase móvel a mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) contendo 1mM de formiato de amônio.

Ficaram definidos os seguintes parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): -4500 V, temperatura: 450 °C, gás de interface (CUR): 10 psi, gás de colisão (CAD): 6 psi, gás de nebulização (GS1): 45 psi e gás auxiliar (GS2): 45 psi.

4.2 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após a otimização do FIA, a coluna *X-Bridge Shield* RP18 150 x 2.1-mm, 5 µm de tamanho de partícula foi acoplada ao sistema. Algumas combinações dos solventes metanol, água, acetonitrila e formiato de amônio foram testados como fase móvel. Condições como velocidade de fluxo (200 a 450 µL/min), temperatura do forno também foram testadas visando a melhor separação e formato dos picos.

Considerando todas as condições avaliadas, acetonitrila:água (95:5 v/v) e solução aquosa de formiato de amônio na concentração de 1mM em modo de eluição gradiente apresentaram os melhores resultados para separação e ionização dos analito, não sendo mais necessário a utilização do aditivo na solução diluente. O formiato de amônio presente na fase móvel foi suficiente para promover a ionização adequada. O ácido fórmico foi mantido em função da melhora na estabilidade dos analitos.

Os primeiros experimentos visando à separação cromatográfica tiveram como base a variação na proporção dos solventes, temperatura e fluxo. Como trata-se de uma análise através do experimento de MRM, a separação dos compostos não é crucial, pois são monitoradas transições específicas, não havendo interferência por sobreposição. Contudo, como a matriz plasma é rica em compostos, é importante afastar os analitos de interesse do volume morto da coluna cromatográfica. No tempo ou volume morto são eluidos todos os outros componentes da matriz que não interagem com a coluna, o que poderia causar a supressão iônica do analito de interesse. Através do gradiente garantimos que a gliotoxina e seu PI não eluam no volume morto, possibilitando uma análise segura, sem interferência dos componentes do plasma. Para os analitos em questão a melhor eficiência e formato dos picos foram obtidos utilizando as seguintes condições:

- Solução diluente : Mistura de acetonitrila:água:ácido fórmico 98:2:0,1 v/v/v

- Fase móvel: Solução aquosa de formiato de amônio na concentração de 1 mM (A) e mistura de acetonitrila/água (95:5 v/v) (B). A fase móvel foi eluída em modo gradiente, conforme segue:
Tempo 0–0,10min: A=65%;
Tempo 0,11–0,7min: A=0%;
Tempo 0,71–4,0min: A=65%
- Fluxo da fase móvel: 450 µL/min;
- Coluna: XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm), 5 µm de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna XBridge RP18 (10 x 2,1 mm), 5 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Mildford, EUA);
- Temperatura da coluna: 45 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fonte de ionização: ESI operando no modo negativo de ionização;
- Aquisição dos dados: *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) com *dwell time* de 450 ms;

O método desenvolvido foi capaz de analisar a gliotoxina de forma rápida, apresentado uma excelente sensibilidade e formato de pico tanto para a gliotoxina quanto para o padrão interno. A elevada seletividade da ferramenta analítica associada a um eficiente gradiente de eluição possibilitou uma análise extremamente eficiente, com um tempo total de quatro minutos. Pode ser considerado um método sem produção excessiva de resíduos, uma vez que se trata de um fluxo baixo e em modo de eluição gradiente no qual não são gastos com fase móvel nem mesmo 1 mL de acetonitrila por análise.

Não foram observadas interferência de outros compostos, mesmo tratando-se de uma matriz rica em metabolitos como o plasma. Apresenta também maior sensibilidade, possibilitando um limite de quantificação dez vezes menor quando comparado a outros métodos como HPTLC (PURI;AHMAD;PANDA, 2009).

O cromatograma do método desenvolvido pode ser observado na Figura 6, p.85.

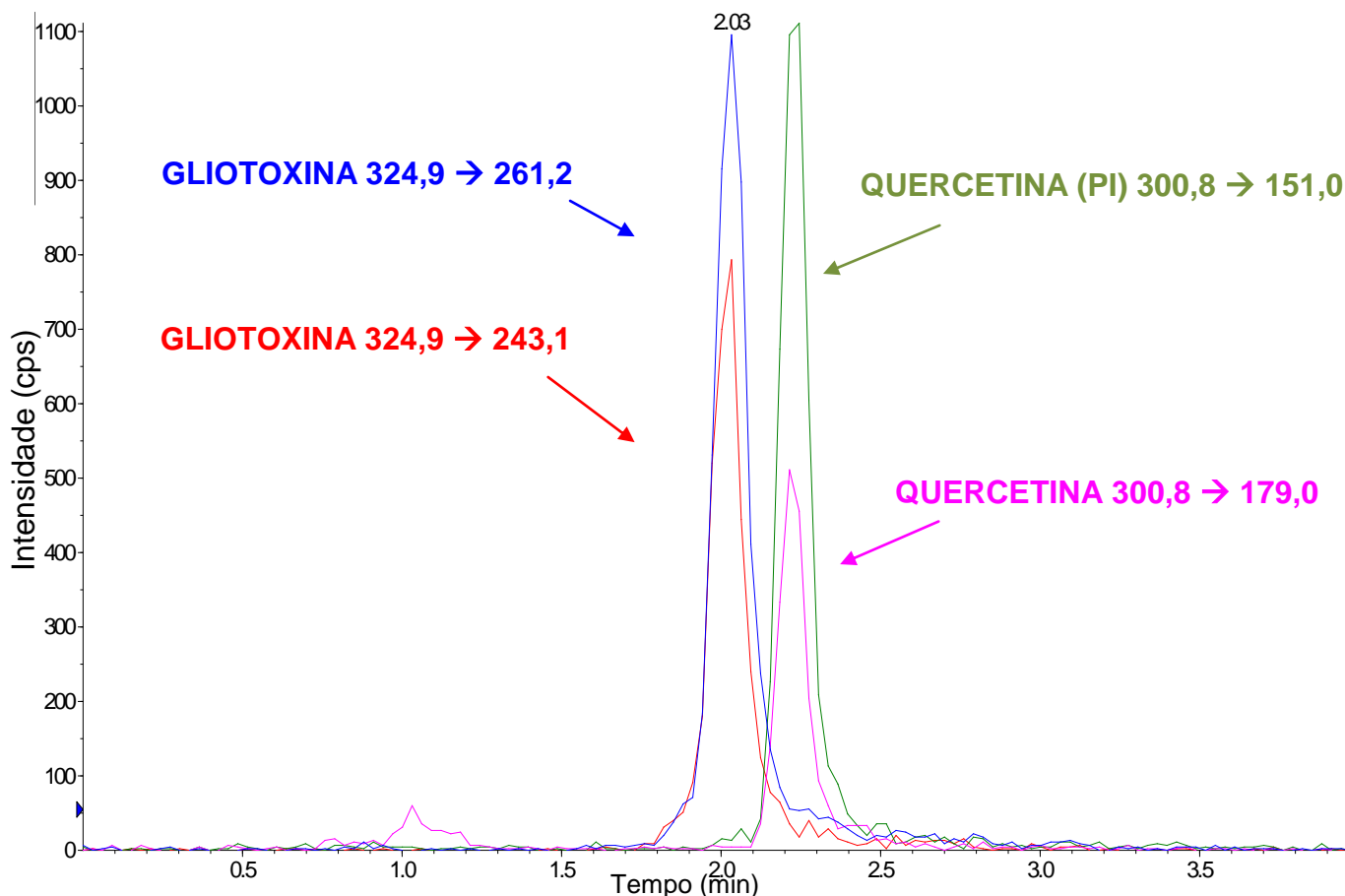


FIGURA 6 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM GLIOTOXINA (70 ng/ mL) E PI (5 ng/ mL).

4.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA GLIOTOXINA DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO

Com o intuito de avaliar a melhor forma de extrair a gliotoxina do plasma humano, diferentes métodos de extração foram testados, dentre eles extração líquido-líquido, extração em fase sólida e precipitação de proteínas. Os ensaios foram conduzidos em sextuplicata, sendo definido o melhor procedimento, aquele que apresentou a maior recuperação dos analitos com desejada reprodutibilidade.

Em testes preliminares utilizando cartucho de extração em fase sólida não foram obtidos resultados satisfatórios. Este resultado pode ser atribuído a incompatibilidade da fase estacionária com o analito. Como se trata de uma matriz muito complexa, diversos interferentes podem ocupar os sítios de ligação

disponíveis na fase estacionária e o analito de interesse de baixa massa molecular deixa de ser retido, diminuindo a taxa de recuperação da gliotoxina.

A extração por precipitação de proteínas, tanto utilizando acetonitrila quanto metanol, também não apresentou a recuperação desejada. Durante o processo de interação proteína-proteína e formação de compostos macromoleculares pode ocorrer o carregamento de moléculas menores, como a gliotoxina, a qual seria eliminada juntamente com o precipitado.

A extração líquido-líquido foi a que apresentou os melhores resultados nos testes preliminares. Utilizando uma ampla faixa de polaridade dos solventes observou-se que os melhores resultados foram obtidos com acetato de etila e éter etílico. A partir daí foram definidos os solventes e mistura de solventes para uma nova avaliação (ver Tabela 3, p.69).

Tendo definido os solventes e as proporções das misturas, foi realizado o teste de extração com cada um deles para comparação dos resultados. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.7, p.70 e os resultados foram plotados na forma de gráfico (Gráfico 1, p.87).

Os experimentos com solventes orgânicos puros apresentaram bons resultados. Como podemos observar no Gráfico 1, o éter etílico, o acetato de etila e o diclorometano apresentaram boa recuperação, porém os valores de desvio padrão e coeficiente de variação foram grandes, 57,41; 10,23 e 16,18%, respectivamente. Isso se deve, entre outros fatores, a alta volatilidade dos solventes, principalmente no caso do éter. Para corrigir essa variação utilizamos a mistura de solventes e foi obtido uma melhora considerável. A mistura éter etílico: acetato de etila 50:50 v/v apresentou resultados ainda melhores em termos de recuperação quando comparado aos solventes isoladamente além de obter os menores valores de desvio padrão (3,32%) entre todos os testes realizados. Por esse motivo, o método de extração utilizado para o desenvolvimento e validação do método analítico foi a extração líquido-líquido, com a mistura éter etílico e acetato de etila na proporção de 50:50 v/v.

O teste utilizando o ultrassom como modo de agitação apresentou uma recuperação menor quando comparado a agitação por vórtex, por essa razão todas as outras amostras foram extraídas utilizando o método mais eficiente.

Quanto à acidificação da amostra com ácido trifluoracético, não foram observados resultados favoráveis e por isso não foram continuados.

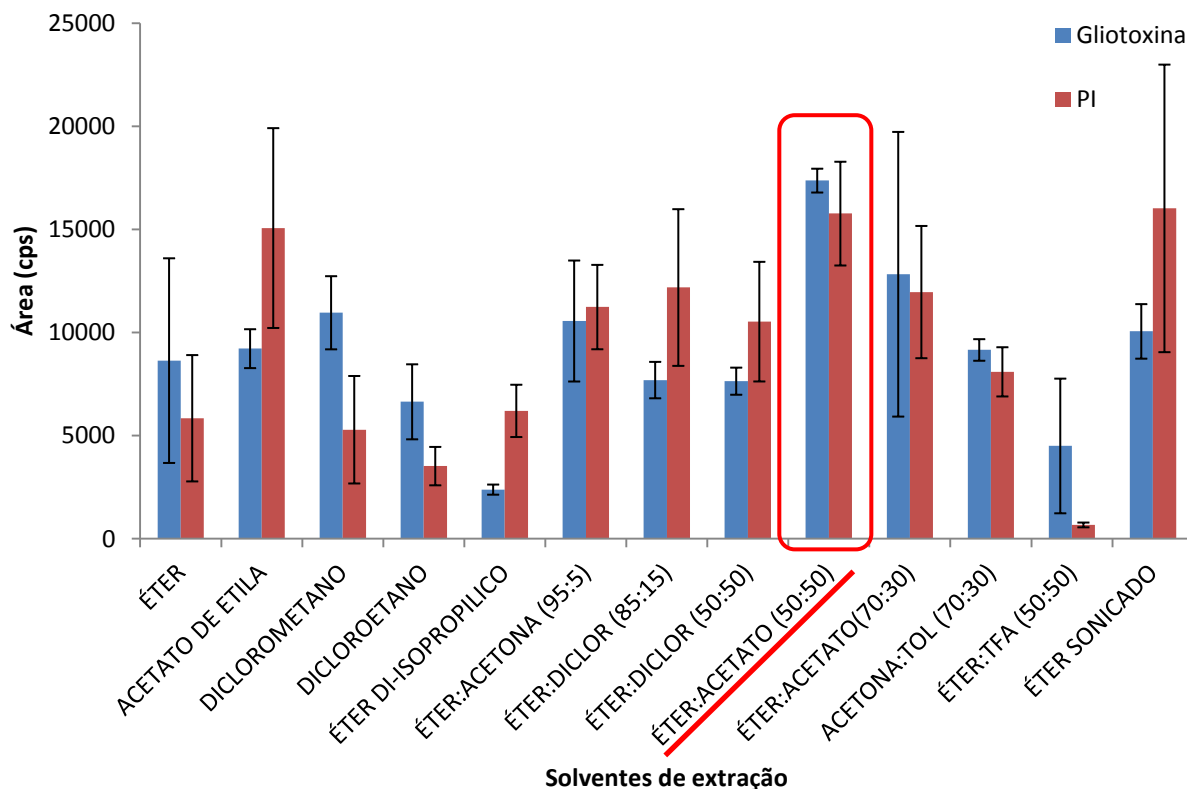


GRÁFICO 1 – ÁREA DOS PICOS DE GLIOTOXINA E PI OBTIDOS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES.

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de métodos bioanalíticos é composta de diversas análises que comprovem a eficácia do método. Para isso, foram realizados ensaios com matriz fortificada com diferentes concentrações do analito que se deseja quantificar. Se o método se mostrar adequado na análise de matriz fortificada ele poderá então avaliar amostras reais.

4.4.1 Seletividade

Para o teste de seletividade foram testados como matriz biológica o plasma branco normal, lipêmico e hemolisado, plasma fortificado com gliotoxina e PI além da matriz soro branco. Como podemos observar na Figura 7, p.89, o presente método não apresentou sinais significativos de interferentes endógenos no tempo de retenção e transição da gliotoxina (A) e do seu padrão interno (B). Através desse resultado foi demonstrado que o método é seletivo para análise de gliotoxina em amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado e, também, em amostras de soro.

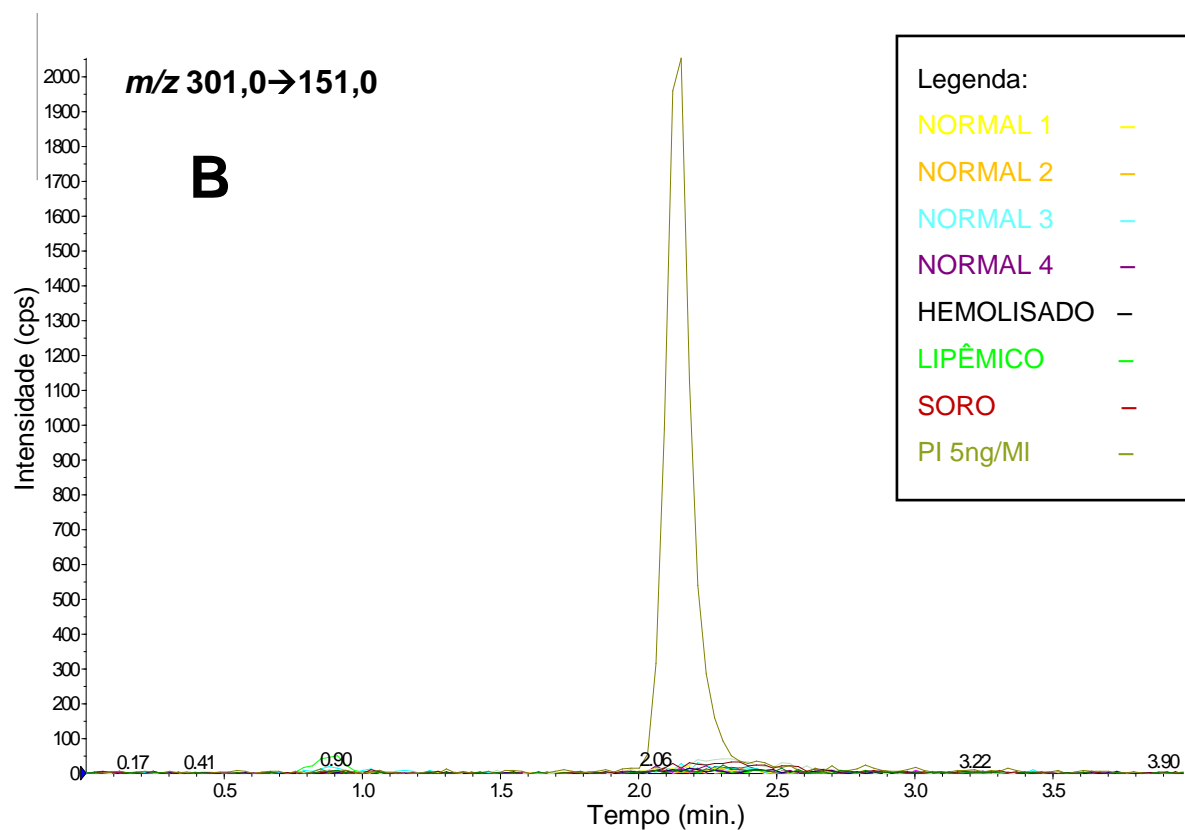
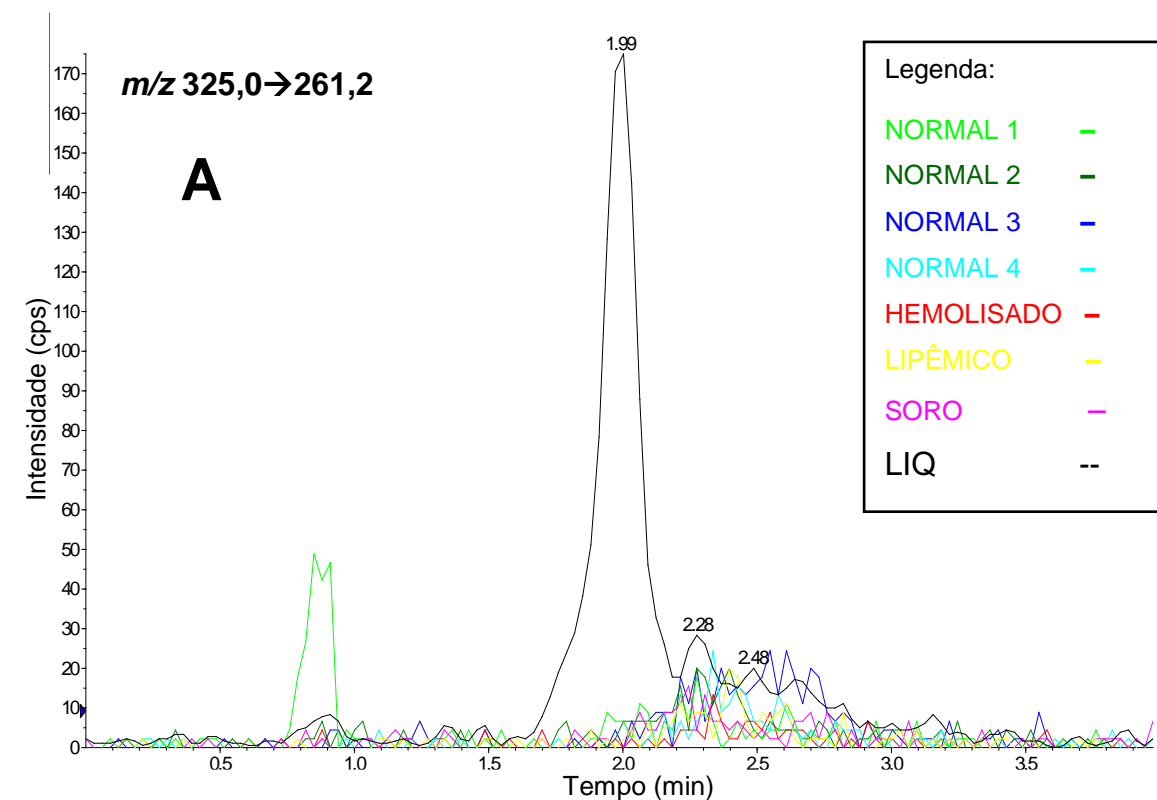


FIGURA 7 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS TRANSIÇÕES DA GLIOTOXINA (A) E PI (B) OBTIDAS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO, LIPÊMICO, BRANCO DE SORO NORMAL E PLASMA FORTIFICADO.

A matriz plasma apresenta vantagens para conservação além de não exigir que a centrifugação seja realizada logo após a coagulação do sangue total, podendo ser coletada em frasco com anticoagulante e posteriormente manipulada, sem que se percam os outros componentes da série vermelha como plaquetas e hemácias. Outra vantagem está na aquisição de material para desenvolvimento de método analítico. Em função das perdas geradas pelo modo de preparo, as bolsas de soro não são disponibilizadas por bancos de sangue, o que dificultaria muito a obtenção dessa matriz para desenvolvimento e validação do trabalho. Apesar do plasma apresentar maior quantidade de interferentes quando comparada ao soro, não foram observadas variações no sinal analítico da gliotoxina e do PI. Diante do exposto e dos resultados do teste de estabilidade selecionamos como matriz biológica o plasma.

4.4.2 Limites de Detecção e Limite Inferior de Quantificação

A alta sensibilidade do método desenvolvido foi demonstrada através do baixo limite de detecção (relação sinal-ruído ≥ 3), estimado em 3 ng/mL para gliotoxina, conforme representado na Figura 8, p.91. A alta sensibilidade do método, juntamente com a especificidade da técnica garantem um método diagnóstico rápido e seguro, essencial para o início do tratamento e assim com isso, reais chances de cura dos pacientes.

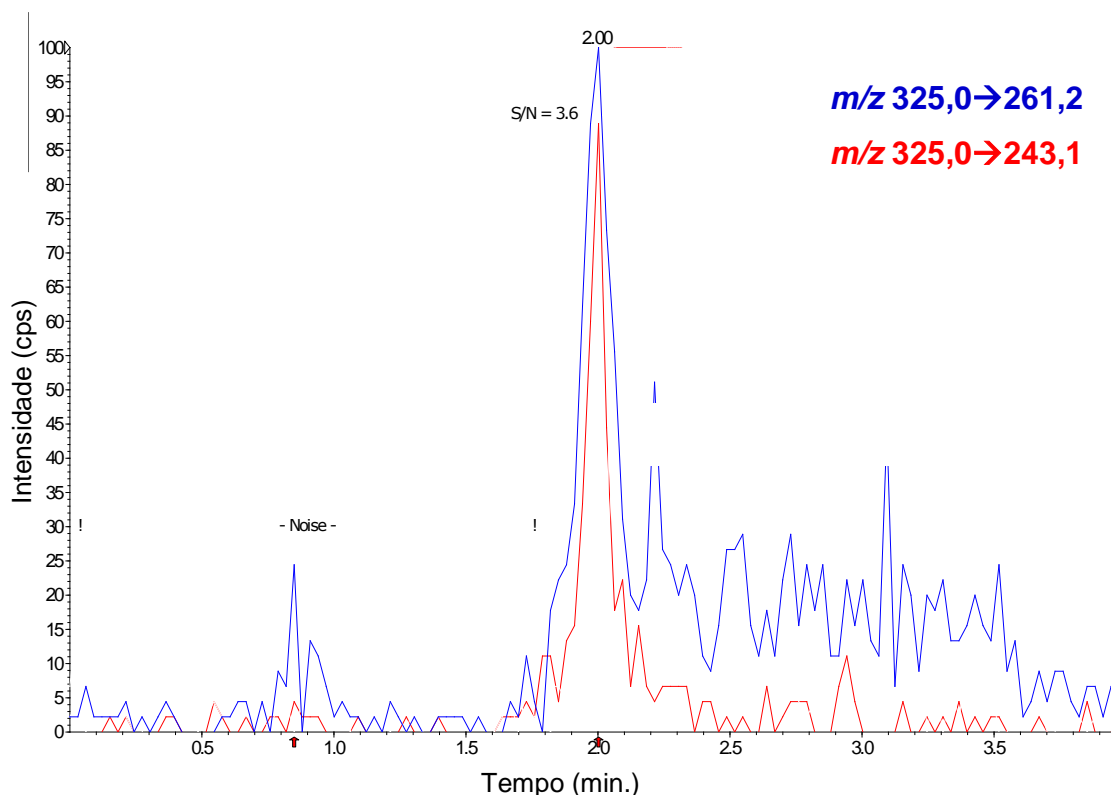


FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DAS TRANSIÇÕES DE GLIOTOXINA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA BRANCO FORTIFICADO NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 3 ng/mL.

Para o limite inferior de quantificação é recomendado que o valor da relação sinal/ruído seja igual ou superior a 10, com comprovada precisão e exatidão. Para a gliotoxina essa condição foi atingida na concentração de 10 ng/ mL, como pode ser observado na Figura 9, p.92, com valores de CV% inferiores a 20%, conforme demonstrado nas Tabelas 10, 11, 12 e 13 (p.96 e 97).

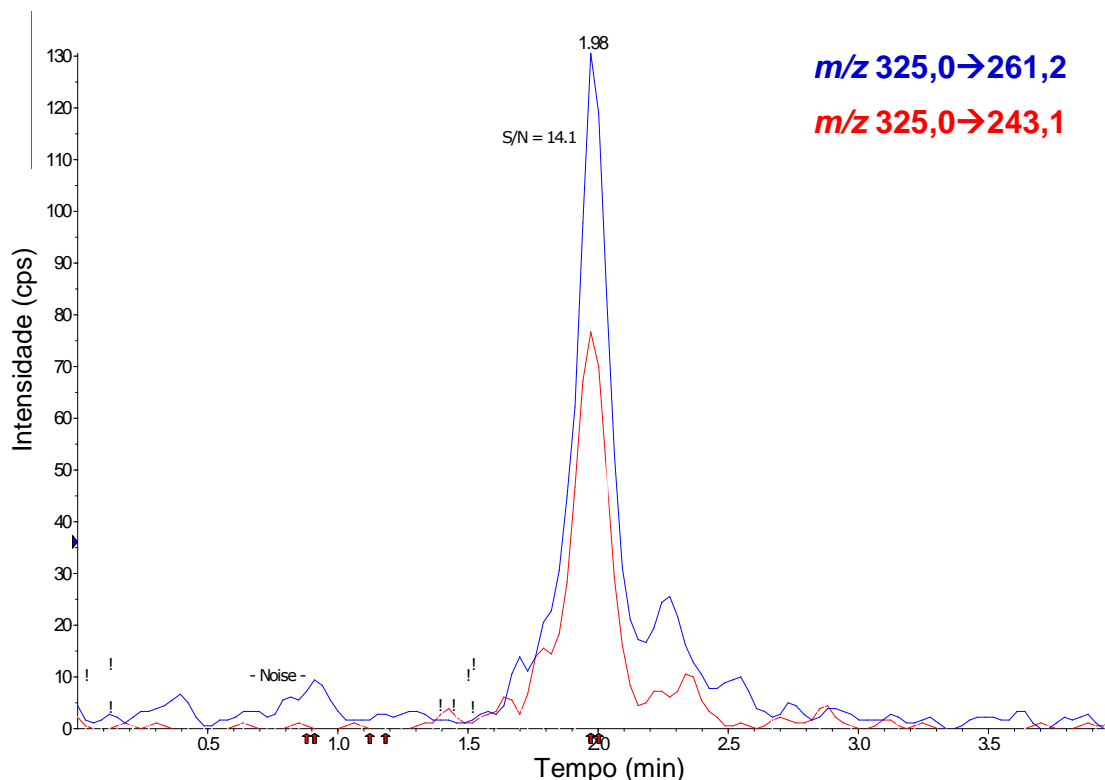


FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DAS TRANSIÇÕES DE GLIOTOXINA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA BRANCO FORTIFICADO NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 10 ng/mL.

4.4.3 Linearidade

A curva de calibração foi gerada a fim de confirmar a relação linear entre a relação das áreas dos picos do analito/áreas dos picos do padrão interno *versus* a relação da concentração do analito/concentração do padrão interno.

Após três dias de ensaios, as curvas de calibração da gliotoxina apresentaram ótima linearidade, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99, conforme é demonstrado nas Figuras 10, 11 e 12 (p.93 e 94).

Em todos os níveis de concentração as variações na precisão (CV%) foram inferiores a 15%, com valores entre 1,15 e 13,13%. Da mesma forma, as variações na exatidão apresentaram valores entre 87,35 e 110,96, como mostram as Tabelas 7, 8 e 9 (p.94 e 95). Estes resultados asseguram a confiabilidade da resposta do analito em todos os níveis de concentração avaliados.

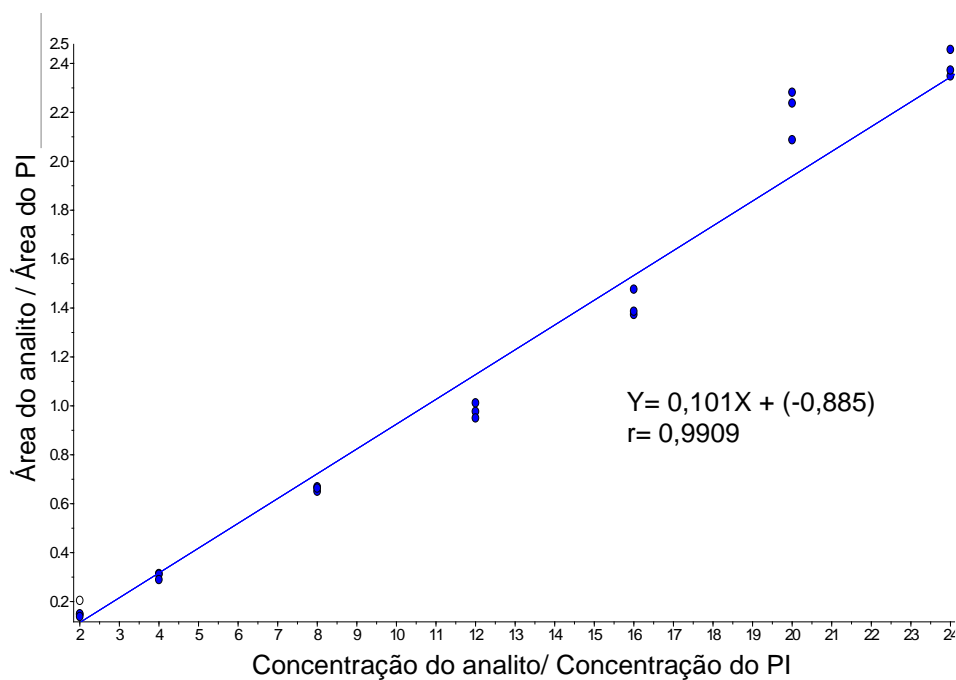


FIGURA 10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLIOTOXINA, 1º DIA.

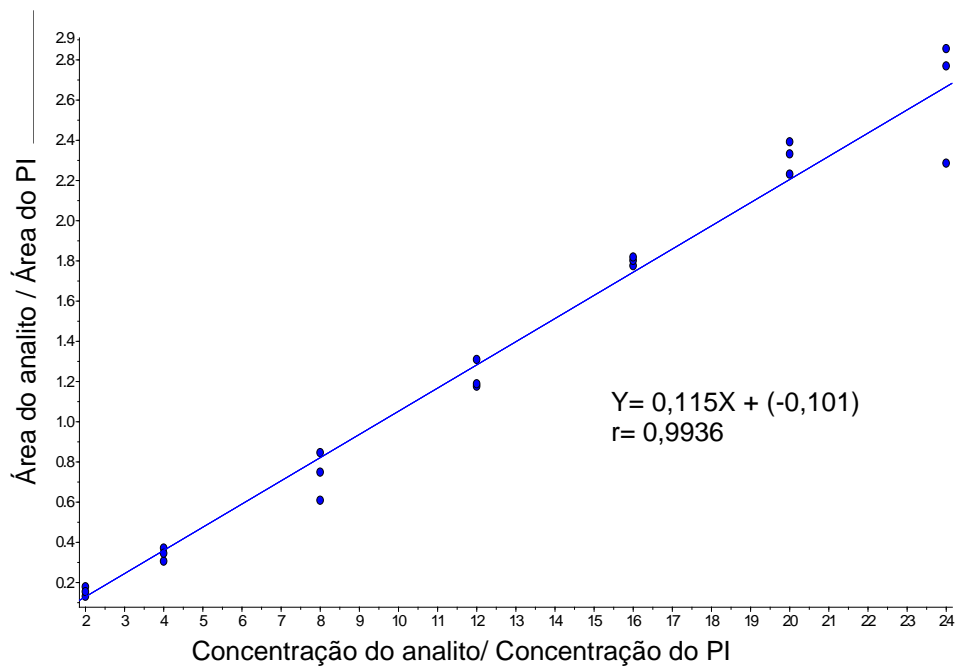


FIGURA 11 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLIOTOXINA, 2º DIA.

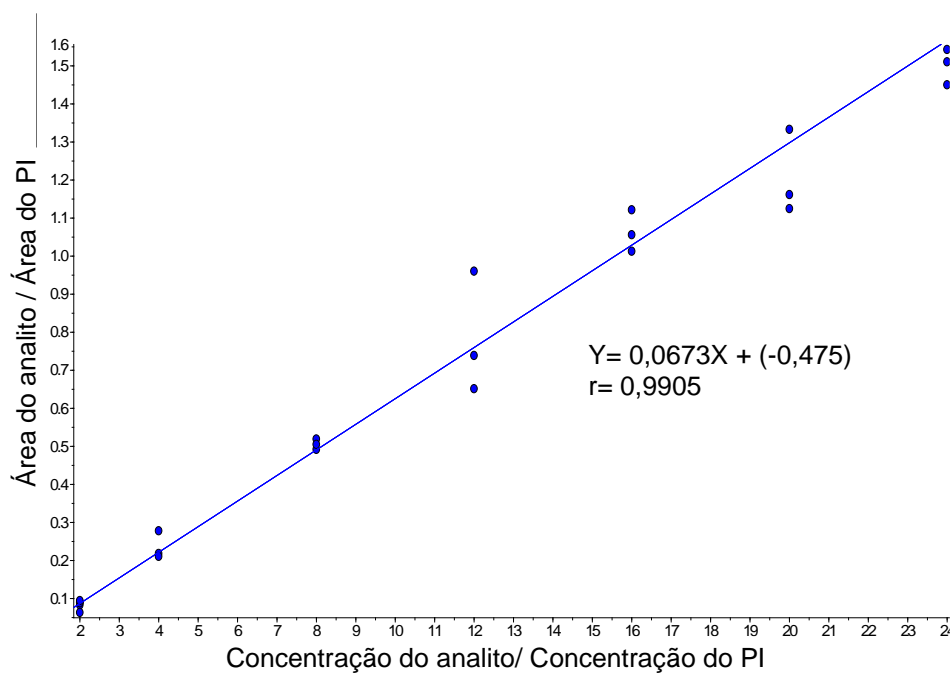


FIGURA 12 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE GLIOTOXINA, 3º DIA.

TABELA 7- LINEARIDADE 1º DIA.

Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Experimental (ng/mL) \pm DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)
10,00	11,46 \pm 1,50	13,07	114,59
20,00	18,70 \pm 0,67	3,61	93,52
40,00	36,48 \pm 0,47	1,28	91,21
60,00	52,41 \pm 1,55	2,95	87,35
80,00	74,01 \pm 2,81	3,80	92,51
100,00	113,47 \pm 5,09	4,48	113,47
120,00	122,98 \pm 2,84	2,31	102,48

NOTA: n=3; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica

TABELA 8- LINEARIDADE 2º DIA.

Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Experimental^a (ng/mL) ± DP	CV^a (%)	Exatidão^b (%)
10,00	11,09 ± 1,03	9,26	110,96
20,00	19,16 ± 1,42	7,43	95,82
40,00	36,24 ± 5,17	14,26	90,59
60,00	57,48 ± 3,19	5,55	95,81
80,00	82,38 ± 0,95	1,15	102,98
100,00	104,91 ± 3,52	3,36	104,91
120,00	118,72 ± 13,32	11,22	98,94

NOTA: n=3; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

TABELA 9- LINEARIDADE 3º DIA.

Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Prática^a (ng/mL) ± DP	CV^a (%)	Exatidão^b (%)
10,00	9,83 ± 0,86	8,74	98,34
20,00	21,24 ± 2,79	13,13	106,20
40,00	41,67 ± 1,03	2,48	104,19
60,00	56,04 ± 4,68	8,35	93,40
80,00	83,95 ± 4,15	4,94	104,94
100,00	94,78 ± 8,42	8,88	94,78
120,00	117,11 ± 3,56	3,04	97,59

NOTA: n=3; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

4.4.4 Precisão e Exatidão

As amostras de controle de qualidade em plasma (CQ) foram utilizadas para verificar a previsão da curva de calibração frente a amostras de concentração conhecida. Essas amostras foram preparadas para determinação dos parâmetros precisão e a exatidão.

Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12, o método pode ser considerado preciso, com valores de CV entre 3,01 e 14,46% para precisão intercorrida e entre 5,13 e 11,44% para precisão intracorrida (Tabela 13, p.97).

TABELA 10- PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 1º DIA.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Experimental (ng/mL) \pm DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
LIQ	10,00	11,12 \pm 0,26	2,31	111,17	11,17
CQB	30,00	29,22 \pm 1,65	5,64	97,39	2,61
CQM	70,00	68,90 \pm 3,14	4,56	98,43	1,57
CQA	110,00	119 \pm 7,99	6,70	108,33	8,33
CQD	70,00	69,79 \pm 3,71	5,31	99,70	0,30

NOTA: n=5; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

TABELA 11- PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 2º DIA.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Experimental (ng/mL) \pm DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
LIQ	10,00	10,46 \pm 0,67	6,40	104,62	4,62
CQB	30,00	32,85 \pm 3,38	10,29	109,50	9,50
CQM	70,00	69,27 \pm 9,47	13,67	98,95	1,05
CQA	110,00	96,43 \pm 2,93	3,03	87,67	12,33
CQD	70,00	78,75 \pm 4,14	5,26	112,50	12,50

NOTA: n=5; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

TABELA 12- PRECISÃO E EXATIDÃO INTRACORRIDA, 3º DIA.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Experimental (ng/mL) \pm DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
LIQ	10,00	10,88 \pm 0,52	4,77	108,83	8,83
CQB	30,00	29,80 \pm 0,92	3,09	99,33	0,67
CQM	70,00	64,75 \pm 2,06	3,18	92,50	7,50
CQA	110,00	99,15 \pm 6,88	6,94	90,14	9,86
CQD	70,00	77,53 \pm 4,66	6,01	110,75	10,75

NOTA: n=5; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

O método também apresentou resultados satisfatórios para o teste de exatidão, com valores de EPR variando entre 0,30 a 11,50% para gliotoxina durante os três dias (Tabelas 10, 11 e 12) e entre 2,07 e 8,21% para exatidão intercorridas (Tabela 13).

As amostras submetidas a teste de diluição (CQD) apresentaram variações para precisão e exatidão equivalentes às variações apresentadas pelos demais controles, como mostram as Tabelas 10, 11, 12 e 13, comprovando que o método de diluição das amostras foi adequado.

TABELA 13 - PRECISÃO E EXATIDÃO INTERCORRIDAS.

Controle de Qualidade	Conc. Teórica (ng/mL)	Conc. Experimental (ng/mL) \pm DP ^a	CV ^a (%)	Exatidão ^b (%)	EPR ^b (%)
LIQ	10,00	10,82 \pm 0,56	5,13	108,21	8,21
CQB	30,00	30,62 \pm 2,66	8,70	102,07	2,07
CQM	70,00	67,64 \pm 6,65	9,83	96,63	3,37
CQA	110,00	104,92 \pm 12,00	11,44	95,38	4,62
CQD	70,00	75,36 \pm 5,61	7,45	107,65	7,65

NOTA: n=15; ^a Variação entre as áreas experimentais ^b Expressa sobre a concentração teórica.

4.4.5 Efeito Residual (*Carryover*)

O resultado do efeito residual pode ser visualizado através da Figura 13, p.99, que apresenta os cromatogramas de duas injeções de uma amostra branco, monitoradas tanto na transição da gliotoxina (A1 e A2) quanto do PI (B1 e B2). Em seguida foi injetada uma amostra fortificada com o limite superior de quantificação (LSQ) e PI (A3 e B3). Após o LSQ, a mesma amostra branco foi injetada novamente (A4 e B4). Não foi observada nenhuma variação no sinal do último branco. O resultado demonstra a ausência de interferentes relativos às análises anteriores, tanto no tempo de retenção do padrão quanto do padrão interno. Foi verificada a ausência de qualquer risco de contaminação entre as amostras analisadas utilizando o método desenvolvido.

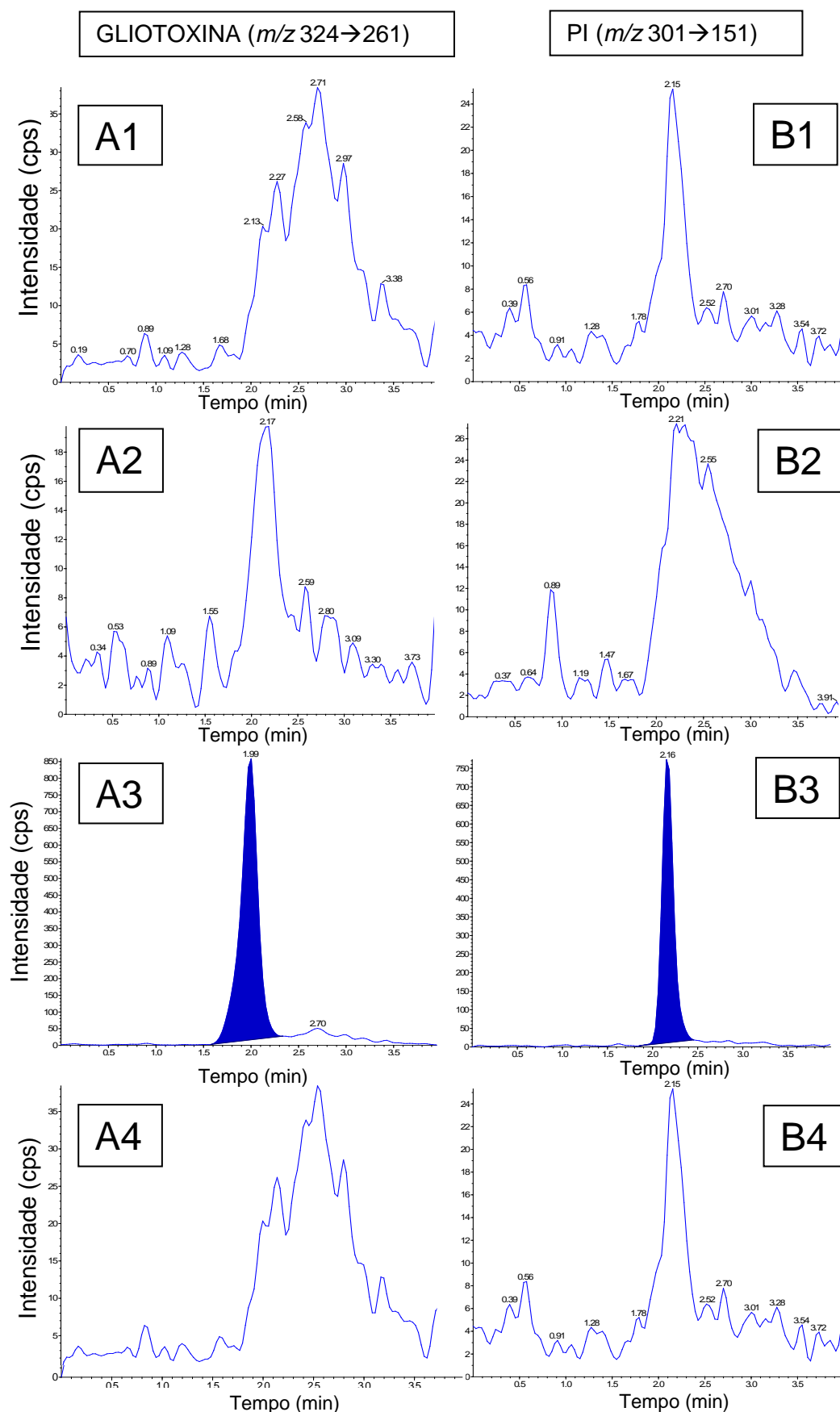


FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL POR CLAE-EM/EM. PLASMA BRANCO (A1, A2, A4 E B1, B2, B4); AMOSTRA FORTIFICADA COM GLIOTOXINA, LSQ, (A3) E COM O PI (B3).

4.4.6 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação dos resultados das áreas obtidas com matriz fortificada com aqueles obtidos em solução, nas mesmas concentrações. Para corrigir as variações do processo de extração, foi utilizado o Fator Matriz Normalizada por PI (FMN), cujo cálculo foi realizado conforme RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), descrito no item 2.9.8, p.56. Os resultados estão dispostos na Tabela 14.

TABELA 14 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ.

Controles	Solução		Matriz		FMN	
	^a Anal/PI ± DP	^b CV (%)	^a Anal/PI ± DP	^b CV (%)	média ± DP	^c CV (%)
CQB	2,39 ± 0,17	7,24	0,94 ± 0,03	3,27	0,39 ± 0,038	9,76
CQA	2,93 ± 0,23	7,82	3,54 ± 0,34	9,65	1,22 ± 0,17	13,94

NOTA: n=8; ^a Área do analito / Área do Padrão Interno; ^b Variação entre as razões das áreas; ^c Variação entre todos os FMNs.

Como podemos observar, os valores de CV% dos FMN variaram entre 9,76 e 13,94%, comprovando que o método não apresenta efeito de matriz que comprometa as análises.

4.4.7 Recuperação

Os resultados individuais de recuperação do analito e do PI após a extração estão apresentados na Tabela 15. Para os compostos analisados a recuperação pode ser considerada satisfatória, superior a 60%, com coeficientes de variação inferiores a 5%. O método de extração líquido-líquido com a mistura éter etílico:acetato de etila (50:50 v/v) foi considerado um método efetivo para extração de gliotoxina e quercetina, tendo como matriz plasma humano.

TABELA 15 – RESULTADO DO TESTE DE RECUPERAÇÃO.

	Fortificado Antes	Fortificado Depois	Recuperação
	área (cps)		%
	19900,00	31700,00	63,95
	19700,00	31200,00	63,30
	18000,00	31100,00	57,84
	18300,00	31000,00	58,80
	19700,00	30600,00	63,30
Média	19120,00	31120,00	61,44
DP	895,54	396,23	2,88
CV%	4,68	1,27	4,68

4.4.8 Teste de Estabilidade

4.4.8.1 Estabilidade de Curta Duração, Pós-Processamento, após Ciclos de Congelamento e Descongelação e de Longa Duração

A Tabela 16 (p.103) apresenta as diferenças entre as áreas de picos obtidos de amostras recém preparadas e amostras armazenadas sob as condições de avaliadas. É possível observar que, sob as condições avaliadas no teste (item 3.8.8, p.77), o CV foi inferior a 15% em todos os experimentos realizados, demonstrando que não há diferenças significativas para a gliotoxina e seu padrão interno frente às diferentes formas de armazenamento e preparo avaliadas. Esse resultado garante que há tempo suficiente para preparo das amostras, sua análise e, se necessário, re-análise sem que ocorram perdas relacionadas à degradação, proporcionando uma quantificação segura e confiável.

TABELA 16 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO, PÓS-PREPARATIVA, APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO E DE LONGA DURAÇÃO.

Concentração (ng/mL)	Curta duração (6 horas)		Pós- Processamento		Ciclo de Congelamento e Descongelamento		Longa Duração	
	^a Área P/ área PI % ± DP	^b CV%	^a Área P/ área PI % ± DP	^b CV%	^a Área P/ área PI % ± DP	^b CV%	^a Área P/ área PI % ± DP	^b CV%
30,00	87,96 ± 4,01	4,56	97,11 ± 4,37	4,50	98,86 ± 4,58	4,64	101,50 ± 5,76	5,68
110,00	90,74 ± 2,82	3,11	96,52 ± 0,32	0,33	95,93 ± 5,86	6,11	95,81 ± 1,87	1,95

NOTA: n=6; P=Padrão de Gliotoxina; PI=Padrão Interno; ^a Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida das amostras recém preparadas (100%); ^b Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

4.4.8.2 Estabilidade das Soluções Estoque e de Trabalho

Através da Tabela 17 (p.105) podemos observar as diferenças encontradas entre as áreas dos picos obtidos de amostras preparadas com soluções de trabalho (1000 ng/ mL) recém preparadas e preparadas a partir de soluções de trabalho após armazenamento. O resultado encontrado revela que as soluções nessa concentração não se mantêm estáveis por períodos de 6 horas, apresentando áreas aproximadamente 20% menores quando comparadas às amostras obtidas com soluções recém preparadas, sendo que o máximo permitido seriam variações de até 10%. Destacamos também a variação do padrão interno, quercetina, o qual apresentou degradação de aproximadamente 60% frente às amostras recém-preparadas. Por esse motivo, todas as soluções utilizadas no desenvolvimento do método foram recém-preparadas a partir das soluções estoque, a 1 mg/mL, armazenada em freezer -40 °C, as quais mantiveram sua estabilidade, com valores de área em torno de 100% quando comparadas às soluções recém preparadas, conforme consta na Tabela 18, p.106.

TABELA 17 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE, PREPARADAS A PARTIR DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO DE 1000 ng/ mL.

Compostos	Concentração (ng/mL)	6 horas de armazenamento		24 horas de armazenamento		48 horas de armazenamento	
		^a Área % ± DP	^b CV%	^a Área % ± DP	^b CV%	^a Área % ± DP	^b CV%
Gliotoxina	30,00	85,02 ± 3,87	4,56	81,25 ± 1,89	2,32	74,64 ± 3,34	4,48
Gliotoxina	110,00	85,99 ± 2,67	3,11	85,97 ± 1,04	1,21	81,75 ± 1,01	1,24
Quercetina	5,00	98,07 ± 3,42	2,54	40,99 ± 4,37	10,67	37,27 ± 1,22	3,27

NOTA: n=6; ^a Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida das amostras fortificadas com solução recém preparadas (100%); ^b Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

TABELA 18 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE, PREPARADAS A PARTIR DAS SOLUÇÕES PADRÃO ESTOQUE DE 1 mg/ mL.

Compostos	Concentração (ng/mL)	6 horas de armazenamento		24 horas de armazenamento		48 horas de armazenamento		30 dias de armazenamento	
		^a Área % ± DP	^b	^a Área % ± DP	^b	^a Área % ± DP	^b	^a Área % ± DP	^b
			CV%		CV%		CV%		CV%
Gliotoxina	30,00	103,18 ± 0,55	5,16	101,06 ± 0,56	5,24	101,43 ± 0,56	5,51	99,15 ± 6,74	2,78
Gliotoxina	110,00	100,36 ± 2,29	7,61	101,97 ± 5,27	4,70	100,48 ± 6,46	6,41	98,44 ± 3,13	3,95
PI	5,00	98,07 ± 3,42	2,54	100,36 ± 2,29	7,61	96,48 ± 4,48	6,64	99,44 ± 2,75	5,05

NOTA: PI= Padrão Interno; n=6; ^a Porcentagem expressa em relação a concentração média obtida das amostras fortificadas com solução recém preparadas (100%); ^b Variação entre as áreas experimentais armazenadas.

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS

O método desenvolvido e validado foi então aplicado a amostras de pacientes com suspeita de aspergilose, com o objetivo de vir a auxiliar o seu diagnóstico. Essas amostras foram cedidas pelo Hospital de Clínicas da UFPR, onde o diagnóstico é feito através do método de ELISA para detecção de galactomanas, juntamente com outros sinais clínicos.

O método imunoenzimático é realizado com base em 3 controles: o controle positivo, o qual deve ter seu resultado superior a 1,5; o controle negativo, o qual deve ter seu resultado abaixo de 0,040 e controle de valor de corte, que deve estar entre 0,30 e 0,80 e define o valor limítrofe, abaixo desse valor a amostra é considerada negativa e acima é considerada positiva. Este método apresenta alta sensibilidade, com um limite de detecção de aproximadamente 1 ng de galactomanana por mL de soro. Entretanto, apesar de resultados bastante promissores, o método revelou altas taxas de resultados falso-positivo para diagnóstico de aspergilose em pacientes pediátricos, com danos no endotélio intestinal, em tratamento com antibióticos betalactâmicos, recém transplantados de medula óssea e em início de quimioterapia citotóxica. Em vista destes resultados, o método por CLAE-EM/EM foi desenvolvido e aplicado às amostras provenientes de pacientes diagnosticados através método de ELISA.

As amostras foram selecionadas com base na detecção de galactomananas através do método imunoenzimático. Foram avaliadas 30 amostras, sendo 10 positivas e 20 negativas. Durante a identificação das amostras, como podemos observar no Gráfico 2, p.108, apenas 5% das amostras negativas são provenientes de quimioterapia e quarto de alto risco, enquanto que dentre as amostras positivas, 50% das amostras estão divididas entre essas duas procedências. É um fato interessante pois, como foi dito, há maior possibilidade de encontrar resultados falso positivos em pacientes em início de quimioterapia e

em terapia medicamentosa a base de antibióticos betalactâmicos, comum em pacientes internados em quarto alto risco.

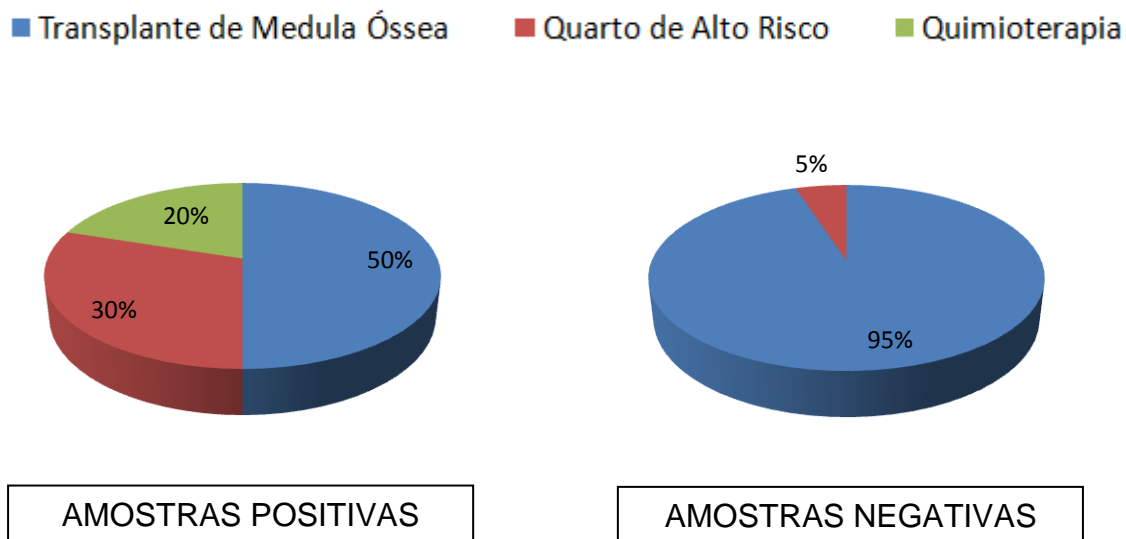


GRÁFICO 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS CONFORME A PROCEDÊNCIA.

Após a avaliação através do método desenvolvido, das 20 amostras negativas por ELISA, três apresentaram sinal de gliotoxina pelo método por CLAE-EM/EM, porém abaixo do limite inferior de quantificação estabelecido. Este resultado indica que o método pode ser mais sensível para o diagnóstico das aspergilose quando comparado ao ELISA. Além deste resultado existem também outros indícios desta hipótese. A espécie responsável pelo maior número de casos de AI é também a principal produtora de gliotoxina e a presença deste metabólito está intimamente relacionada à infecção fúngica enquanto que a galactomanana é, além de um componente da parede celular dos fungos, uma substância encontrada em diversas frutas presentes na alimentação, podendo então ser encontrada na amostra como um contaminante e não em função da infecção.

As ferramentas analíticas utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho também são responsáveis pela eficiência do método. O CLAE-EM/EM é uma técnica altamente seletiva e sensível, características essenciais a um método diagnóstico. Embora o método enzimático seja baseado na reação específica antígeno-anticorpo, o anticorpo é moldado com base em uma região da molécula,

a qual pode estar presente também em outros compostos não relacionados ao fungo.

Das 10 amostras positivas, cinco apresentaram sinal de gliotoxina, sendo quatro abaixo do limite de quantificação (10 ng/mL) e uma acima do limite superior de quantificação (120 ng/ mL). A amostra acima do limite superior de quantificação não foi tratada conforme o procedimento de diluição em razão da falta de amostra para repetição do ensaio. Quanto as amostras positivas, podemos observar através do Gráfico 3, p.110, que 40% delas apresentaram valores inferiores a 0,80 no teste de ELISA, próximos aos resultados do controle de valor de corte, o que poderia gerar uma insegurança quanto a positividade desses resultados (ver Tabela 20, p. 114). O método desenvolvido não apresenta essa dificuldade, pois não há necessidade de valor de corte. Toda amostra na qual for detectada a presença de gliotoxina pode ser considerada positiva, isso porque, esse metabólito não é encontrado na corrente sanguínea na ausência da infecção. Além disso, a forma de detecção por absorbância utilizada no método de ELISA é muito pouco seletiva, podendo sofrer interferência de diversos componentes da matriz. Utilizando da ferramenta do MRM, a espectrometria de massas consegue eliminar grande parte da interferência de outras moléculas, e por esse motivo é a metodologia de escolha para análise de matrizes complexas como o plasma.

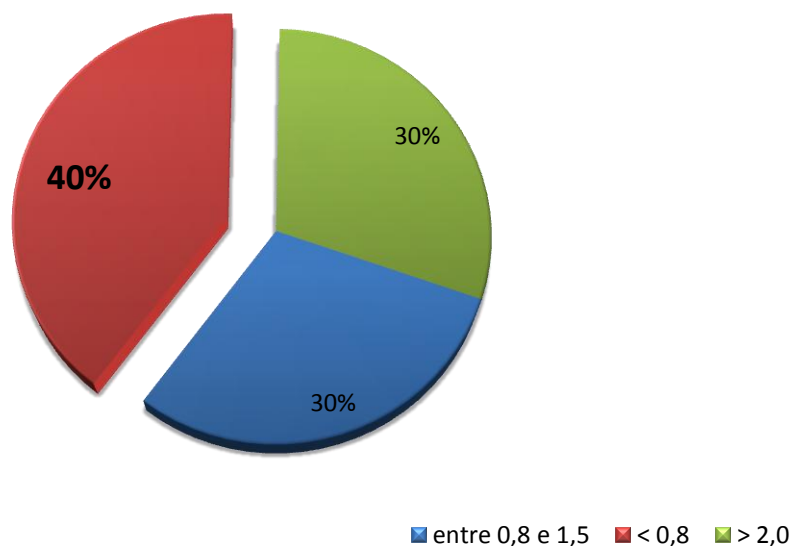


GRÁFICO 3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DOS RESULTADOS DO TESTE DE ELISA PARA AMOSTRAS POSITIVAS.

Também observamos que a maior parte (85%, Gráfico 4, p.111) das amostras provenientes dos setores de quimioterapia e quarto de auto-risco obtiveram diagnóstico positivo frente ao teste e ELISA para detecção de galactomananas e apenas uma das amostras destes setores foi classificada como negativa. Foi observado que as amostras destes setores do hospital apresentavam variações de cor e consistência facilmente verificadas quando comparadas as outras amostras.

Para que não fosse considerado o caso de um resultado falso-positivo seria importante que esses resultados fossem confirmados por outros métodos, como a cultura associada à tomografia computadorizada. É muito comum que pacientes de alto risco e sob tratamento quimioterápico sejam submetidos a terapias profiláticas a base de antibióticos betalactâmicos, já comprovadamente conhecidos como causadores de falso-positivos em testes de ELISA para detecção de galactomananas (VIBOON BOONSARNGSUK ;SRIWANICHRAK, 2010).

O tratamento da aspergilose em pacientes falso-positivos além de aumentar os gastos com medicamentos desnecessários, promove o aumento de resistência

à uma classe importantes de fármacos, os anti-fúngicos. Esses medicamentos são muito eficazes, não apresentam uma gama muito ampla de representantes e o aumento a resistência passa a ser preocupante. O principal agravante do tratamento desnecessário de pacientes falso-positivos está na toxicidade causada por esses fármacos. Os pacientes com suspeita da infecção oportunista estão em quadros de imunossupressão severa e debilitados e a utilização indevida de drogas prejudica ainda mais o já enfraquecido organismo que muitas vezes não consegue se reestabelecer

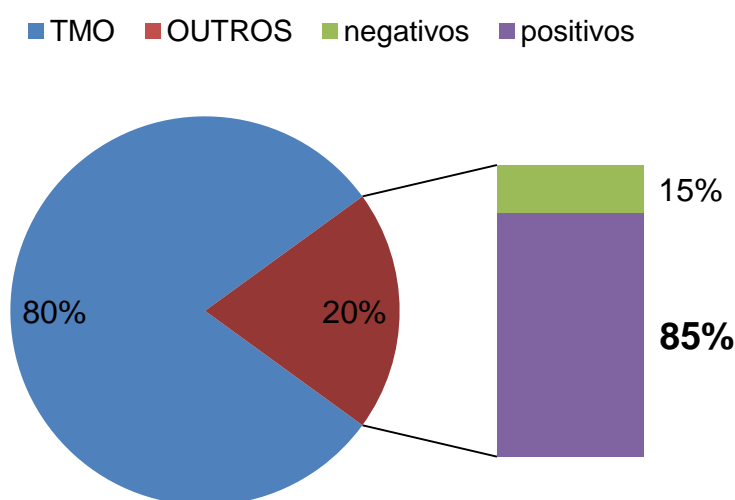


GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CONFORME PROCEDÊNCIA E PORCENTAGEM DE POSITIVAS E NEGATIVAS DENTRE AS AMOSTRAS DE QUIMIOTERAPIA E DE QUARTO ALTO RISCO.

Os resultados obtidos através do método desenvolvido são bastante coerentes, pois, como podemos observar no Gráfico 5, p.112, mais de 70% dos resultados encontrados através do método por CLAE-EM/EM para detecção de gliotoxina estavam em acordo com os resultados obtidos pelo método de ELISA para detecção de galactomananas. Apesar do pequeno número de amostras (n=30), técnicas analíticas e analitos diferentes, os resultados encontrados nas duas técnicas foram semelhantes e as diferenças observadas já eram esperadas. O método confirmou cinco das dez amostras positivas (Tabela 20, p.114), o que era previsto em função dos possíveis resultados falso-positivos do método imunoenzimático, e três das 20 amostras negativas apresentaram sinais abaixo

do limite de quantificação (Tabela 19, p. 113), sugerindo um diagnóstico precoce da aspergilose quando comparado ao método atualmente utilizado.

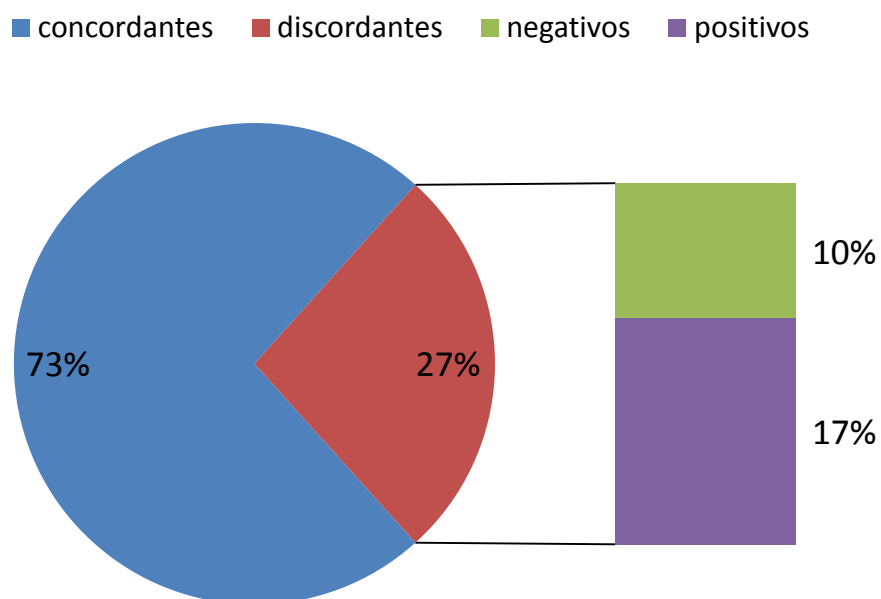


GRAFICO 5 - COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS MÉTODOS DE ELISA E CLAE-EM/EM.

TABELA 19 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS NEGATIVAS (ELISA) E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO MÉTODO ELISA E CLAE-EM/EM.

AMOSTRA	SEXO	PROCEDÊNCIA	ELISA	CLAE-EM/EM
1	F	TMO	0,027	-
2	M	QT	0,046	-
3	M	TMO	0,029	-
4	M	TMO	0,032	-
5	F	TMO	0,042	-
6	F	TMO	0,052	-
7	M	TMO	0,121	+
8	M	TMO	0,040	-
9	M	TMO	0,024	-
10	M	TMO	0,145	+
11	M	TMO	0,045	-
12	M	TMO	0,072	+
13	M	TMO	0,020	-
14	M	TMO	0,286	-
15	F	TMO	0,028	-
16	F	TMO	0,030	-
17	F	TMO	0,033	-
18	F	TMO	0,019	-
19	M	TMO	0,022	-
20	M	TMO	0,067	-

NOTA: F= Feminino; M= Masculino; TMO = Transplante de Medula Óssea; QT= Quimioterapia; - = não observado sinal analítico; + = sinal analítico presente, abaixo do LIQ.

TABELA 20 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS (ELISA) E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO MÉTODO ELISA E CLAE-EM/EM.

AMOSTRA	SEXO	PROCEDÊNCIA	ELISA	CLAE-EM/EM
1	M	QT AR	2,940	+++
2	F	TMO	2,524	-
3	F	QT AR	0,606	+
4	F	QT	0,691	+
5	M	TMO	2,500	+
6	F	QT AR	1,230	-
7	F	QT	1,739	-
8	M	TMO	1,128	-
9	M	TMO	0,584	-
10	M	TMO	0,716	+

NOTA: F= Feminino; M= Masculino; TMO = Transplante de Medula Óssea; QT= Quimioterapia; QT AR= Quarto Alto Risco; - = não observado sinal analítico; + = sinal analítico presente, abaixo do LIQ; +++= Sinal analítico presente, acima do LSQ.

5 CONCLUSÃO

O método por CLAE-EM/EM desenvolvido nesse estudo apresentou-se adequado para quantificação de gliotoxina em plasma humano, sendo o único completamente validado de acordo com a regulamentação vigente para este analito.

Os parâmetros de validação indicaram que o método é sensível, com limite de detecção de 3 ng/mL e limite inferior de quantificação de 10 ng/mL; seletivo para gliotoxina em plasma normal, lipêmico, hemolisado e soro normal; linear na faixa entre 10 e 120 ng/mL com r de, no mínimo, de 0,9905; preciso, com variações máximas de 13,67%; exato, com erros máximos de 12,50% e livre de efeitos residuais e de matriz.

Os estudos de estabilidade demonstraram que para o sucesso das análises o tempo de estocagem das soluções de trabalho deve ser mínimo, sendo assegurada apenas a estabilidade de soluções preparadas diariamente.

O ensaio com amostras de pacientes imunossuprimidos confirmou a aplicabilidade do método às reais condições de análise. Foi observado que é perfeitamente possível que essas amostras sejam avaliadas através do método desenvolvido, o qual apresentou resultados muito coerentes quando comparado a atual técnica de escolha para o diagnóstico. Os resultados sugerem que o novo método seja mais seletivo, reduzindo a quantidade de falso-positivo, e sensível, capaz de promover um diagnóstico precoce, reduzindo também o caso de resultados falso-negativos.

O presente trabalho confirmou que é possível quantificar a gliotoxina em plasma através da técnica de CLAE-EM/EM e novos estudos para aplicação do método como diagnóstico são muito promissores. A proposta não é substituir os métodos atuais e sim colaborar para que, em conjunto, sejam eliminadas as limitações de cada ferramenta. Com as devidas adequações será possível fazer o diagnóstico rápido e preciso em poucos minutos, possibilitando o tratamento da infecção no seu início, aumentando consideravelmente as chances de cura desses pacientes.

Novos ensaios com um número maior e maior quantidade de amostras devem ser realizados, possibilitando assim aumentar a sensibilidade através da concentração das amostras e também garantir maior confiabilidade dos dados utilizando mais replicatas. Além disso, para garantir que as amostras consideradas positivas sejam mesmo provenientes de pacientes com a infecção aspergilose, descartando qualquer hipótese de falso-positivo, as amostras positivas deverão ser confirmadas através de crescimento em cultura e tomografia computadorizada.

REFERÊNCIAS

ABTO. **Registro Brasileiro de Transplantes**. São Paulo Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. XVIII 2011.

ALEXANDER, B. D. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. **Transpl Infect Dis**, v. 4 Suppl 3, n., p.32-7, 2002.

ANSORG, R.; VAN DEN BOOM, R.; RATH, P. M. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. **Mycoses**, v. 40, n. 9-10, p.353-7, 1997.

ASCIOGLU, S. *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p.7-14, 2002.

BAHIA, M. C. F. D. *et al.* The structures of polysaccharides and glycolipids of *Aspergillus fumigatus* grown in the presence of human serum. **Mycopathologia**, v. 137, n. 1, p.17-25, 1997.

BAUER, J. *et al.* Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. **J Med Vet Mycol**, v. 27, n. 1, p.45-50, 1989.

BELLOCCHIO, S. *et al.* Immunity to *Aspergillus fumigatus*: the basis for immunotherapy and vaccination. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, n., p.S181-8, 2005.

BHABHRA, R.; ASKEW, D. S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, n., p.S87-93, 2005.

BLAHOVÁ, E.; BRANDSTETEROVÁ, E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. **Chemical Papers**, v. 58, n. 5, p.362-373, 2004.

BONDY, G. S.; PESTKA, J. J. Immunomodulation by fungal toxins. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 3, n. 2, p.109-43, 2000.

BRASIL. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF 2003.

_____. Diário Oficial da União. ANVISA. Resolução n 899 de 29 maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília-DF. Disponível. Acesso.

_____. **RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro de medicamentos.** Diário Oficial da União. Brasília, DF: ANVISA 2012.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica.** 22. ed. Rio de Janeiro: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA, 2005.

BUCHHEIDT, D. *et al.* Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: Clinical results. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p.428-435, 2001.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação.** ed. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CATALDI, T. R.; BIANCO, G.; ABATE, S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). **J Mass Spectrom**, v. 43, n. 1, p.82-96, 2008.

CHO, W. C. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. **Mol Cancer**, v. 6, n., p.25, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a Líquido de Alto Desempenho.** 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

COLE, R. B. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry-fundamentals, Instrumentation & Applications.** ed. New York: John Wiley&Sons, 1997.

COMERA, C. *et al.* Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. **Microbes Infect**, v. 9, n. 1, p.47-54, 2007.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DEL PALACIO, A.; CUETARA, M. S.; PONTON, J. [Invasive aspergillosis]. **Rev Iberoam Micol**, v. 20, n. 3, p.77-8, 2003a.

_____. [Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis]. **Rev Iberoam Micol**, v. 20, n. 3, p.90-8, 2003b.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clin Biochem**, v. 36, n. 6, p.471-81, 2003.

EMMANOUILIDES, C.; GLASPY, J. Opportunistic infections in oncologic patients. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 10, n. 4, p.841-60, 1996.

FDA. **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation.** SERVICES, U. S. D. O. H. A. H.: Food and Drug Administration 2001.

FITZPATRICK, L. R.; WANG, J.; LE, T. In vitro and in vivo effects of gliotoxin, a fungal metabolite: efficacy against dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. **Dig Dis Sci**, v. 45, n. 12, p.2327-36, 2000.

FLANAGAN, R. J. *et al.* Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY**, v. 20, n. 1, p.530-538, 2006.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p.140-50, 2003.

GREENE, R. The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, n., p.S147-54, 2005.

HEBART, H. *et al.* Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. **Blood**, v. 100, n. 13, p.4521-8, 2002.

HERBRECHT, R. *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. **N Engl J Med**, v. 347, n. 6, p.408-15, 2002.

_____. *Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients.* **J Clin Oncol**, v. 20, n. 7, p.1898-906, 2002.

HILTERMANN, T. J. *et al.* Bilateral cavitary pulmonary consolidations in a patient undergoing allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia. **Chest**, v. 123, n. 3, p.929-34, 2003.

HOPE, W. W.; WALSH, T. J.; DENNING, D. W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 10, p.609-22, 2005.

HOPWOOD, V. *et al.* Use of the Pastorex *Aspergillus* Antigen Latex Agglutination-Test for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, n. 3, p.210-213, 1995.

HUSAIN, S. *et al.* Performance characteristics of the platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in bronchoalveolar lavage fluid. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 12, p.1760-3, 2008.

ICH. **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: text and methodology.** INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE 2005. 13 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. março, 2003. Disponível. Acesso.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p.649-666, 1995.

JARQUE, I. *et al.* [Value of Aspergillus galactomannan antigen detection in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis in hematological patients]. **Rev Iberoam Micol**, v. 20, n. 3, p.116-8, 2003.

KAMI, M. *et al.* Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p.1504-1512, 2001.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p.232-244, 2003.

KAWAZU, M. *et al.* Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. **Am J Hematol**, v. 72, n. 1, p.27-30, 2003.

KOHNO, S. *et al.* An evaluation of serodiagnostic tests in patients with candidemia: beta-glucan, mannan, candida antigen by Cand-Tec and D-arabinitol. **Microbiol Immunol**, v. 37, n. 3, p.207-12, 1993.

KONTOYIANNIS, D. P. *et al.* Itraconazole added to a lipid formulation of amphotericin B does not improve outcome of primary treatment of invasive aspergillosis. **Cancer**, v. 103, n. 11, p.2334-7, 2005.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 20, p.1357-67, 2005.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S. Mycotoxigenicity of clinical and environmental Aspergillus fumigatus and A. flavus isolates. **Acta Pharm**, v. 55, n. 4, p.365-75, 2005.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

LATGE, J. P. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p.310-50, 1999.

_____. The pathobiology of Aspergillus fumigatus. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 8, p.382-9, 2001.

LATGE, J. P. *et al.* Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of Aspergillus fumigatus. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p.5424-33, 1994.

LESCHER-BRU V., C. A., PERNOT-MARINO E., KOENIG H., EYER D., WALLER J., CONDOLFI E. . Aspergillus galactomannan antigen detection with Platelia

Aspergillus: multiple positive antigenemia without Aspergillus infection. **Journal of Medical Mycology**, v. 8, n., p.2, 1998.

LEWIS, R. E. *et al.* Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p.635-7, 2005.

LIU, J. Q. *et al.* [Detection of Aspergillus infection in blood of malignant hematopoietic tumor patients by two-step polymerase chain reaction]. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**, v. 44, n. 10, p.726-9, 2005.

LOBODA, A. V. *et al.* A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 14, n. 12, p.1047-57, 2000.

LOMBARDI, G. *et al.* Multicenter evaluation of an enzyme immunoassay (Platelia Aspergillus) for the detection of Aspergillus antigen in serum. **Mycopathologia**, v. 155, n. 3, p.129-33, 2002.

MA, J. *et al.* A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1, n. 2, p.219-226, 2008.

MACHETTI, M. *et al.* Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. **Bone Marrow Transplant**, v. 21, n. 9, p.917-21, 1998.

_____. Kinetics of galactomannan in surgical patients receiving perioperative piperacillin/tazobactam prophylaxis. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 4, p.806-10, 2006.

MAERTENS, J. *et al.* Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p.1297-1306, 2002.

_____. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. **Blood**, v. 97, n. 6, p.1604-1610, 2001.

MARQUES, L. A. **Aplicação de técnicas avançadas de espectrometria de massas em ciências de alimentos e perfumaria**. 85 f. - Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2006.

MARR, K. A.; PATTERSON, T.; DENNING, D. Aspergillosis - Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p.875-+, 2002.

MATTEI, D. *et al.* False-positive *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p.5362-5363, 2004.

MAURER, H. H. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 713, n. 1, p.3-25, 1998.

MAURER, W. *et al.* [3D localization of electrodes on and in the human body based on biplanar roentgen images]. **Biomed Tech (Berl)**, v. 43 Suppl, n., p.474-5, 1998.

MENNINK-KERSTEN, M. A. S. H.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p.349-357, 2004.

MILLON, L. *et al.* Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p.5097-5101, 2005.

MIYAZAKI, T. *et al.* Plasma (1-3)-Beta-D-Glucan and Fungal Antigenemia in Patients with Candidemia, Aspergillosis, and Cryptococcosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p.3115-3118, 1995.

MULLBACHER, A. *et al.* Selective resistance of bone marrow-derived hemopoietic progenitor cells to gliotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 11, p.3822-5, 1987.

NIESSEN, W. M. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 856, n. 1-2, p.179-97, 1999.

NISHIDA, S. *et al.* Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b(558) in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p.235-244, 2005.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p.8-35, 2009.

NUCCI, M.; MAIOLINO, A. Infecções em transplante de medula óssea. **Medicina Clínica**, v. 33, n. 3, p.278-293, 2000.

O'FEL, A. **Parasitologie Mycologie**. 5. ed. Saint-Maur: Format Utile, 1997.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. Diagnosis of invasive fungal infections: current limitations of classical and new diagnosis methods. **European Oncology Review**, v., n., p.11, 2005.

PATTERSON, T. F. *et al.* Effect of immunosuppression and amphotericin B on *Aspergillus* antigenemia in an experimental model. **J Infect Dis**, v. 158, n. 2, p.415-22, 1988.

PAZOS, C.; DEL PALACIO, A. [Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia *Aspergillus*]. **Rev Iberoam Micol**, v. 20, n. 3, p.99-102, 2003.

PEIXINHO, P. *et al.* [Invasive pulmonary aspergillosis]. **Acta Med Port**, v. 16, n. 2, p.97-9, 2003.

POLESELLO, S. How to present an analytical method. **Food Chemistry**, v. 58, n., p.145-147, 1996.

PURI, A.; AHMAD, A.; PANDA, B. P. Development of an HPTLC-based diagnostic method for invasive aspergillosis. **Biomed Chromatogr**, v. 24, n. 8, p.887-92, 2009.

RAJA, N. S.; SINGH, N. N. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 39, n. 1, p.73-7, 2006.

RIBANI, M. *et al.* Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RICHARD, J. L.; DEBEY, M. C. Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poult by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Mycopathologia**, v. 129, n. 2, p.111-5, 1995.

RICHARD, J. L.; DVORAK, T. J.; ROSS, P. F. Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. **Mycopathologia**, v. 134, n. 3, p.167-70, 1996.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 56 Suppl 1, n., p.i5-i11, 2005.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection diagnosis and management**. 3. ed. Oxford: **Victoria Blackwell Publishing Ltd**, 2003.

SHAH, V. P. The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **The APPS Journal**, v. 9, n. 1, p.43-47, 2007.

SHARMA, O. P.; CHWOGULE, R. Many faces of pulmonary aspergillosis. **Eur Respir J**, v. 12, n. 3, p.705-15, 1998.

SHIN, J. *et al.* Simplified method for determination of clarithromycin in human plasma using protein precipitation in a 96-well format and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 1, p.130-134, 2008.

SIUZDAK, G. *et al.* Mass spectrometry and viral analysis. **Chem Biol**, v. 3, n. 1, p.45-8, 1996.

SMYTH, W. F. Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 824, n. 1-2, p.1-20, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. ed. Danvers: John Wiley & Sons, 1997.

STANZANI, M. *et al.* Aspergillus fumigatus suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. **Blood**, v. 105, n. 6, p.2258-65, 2005.

STEINBACH, W. J. Pediatric invasive aspergillosis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n. 10, p.964-5, 2010.

STEVENS, D. A. Diagnosis of fungal infections: current status. **J Antimicrob Chemother**, v. 49 Suppl 1, n., p.11-9, 2002.

STYNEN, D. *et al.* A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 2, p.497-500, 1995.

SUTTON, P.; WARING, P.; MULLBACHER, A. Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. **Immunol Cell Biol**, v. 74, n. 4, p.318-22, 1996.

SWANINK, C. M. *et al.* Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 1, p.257-60, 1997.

TAYLOR, A. The toxicology of sporidesmins and other epipolythiodioxopiperazines. **Microbial Toxins**, v. 7, n., p. 337–376, 1971.

TOMEI, J. F.; KAUFFMAN, H. F. Putative virulence factors of Aspergillus fumigatus. **Clin Exp Allergy**, v. 30, n. 4, p.476-84, 2000.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 30 - NF 25. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. ed. Chester: Widener University, 1997.

VEENSTRA, T. D. *et al.* Biomarkers: mining the biofluid proteome. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 4, p.409-18, 2005.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

VIBOON BOONSARNGSUK , A. N., CHALERMPORN; SRIWANICHRAK, T. K. **False-positive serum and bronchoalveolar lavage Aspergillus galactomannan assays caused by different antibiotics. Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 42, n., p.461–468, 2010.

VISCOLI, C. *et al.* False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 6, p.913-6, 2004.

WAL, P. *et al.* Bioanalytical method development –Determination of drugs in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 10, p.333-347, 2010.

WARING, P.; BEAVER, J. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 8, p.1311-6, 1996.

WATSON, J. T. **Introduction Mass Spectrometry**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1997.

WEN, J. *et al.* High-throughput determination of fudosteine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, following protein precipitation in the 96-well plate format **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 1, p.153-159, 2008.

WHEAT, L. J. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. **Transpl Infect Dis**, v. 5, n. 4, p.158-66, 2003.

WHEAT, L. J.; WALSH, T. J. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 4, p.245-51, 2008.

YANG, L. *et al.* Validation and application of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of SCH 211803 in rat and monkey plasma using automated 96-well protein precipitation **Journal of Chromatography B**, v. 799, n. 2, p.271-280, 2004.